

**Université de Sherbrooke**

**MÉCANISMES D'ACTION DE LA TYROSINE PHOSPHATASE SHP-1 DANS LE  
CONTRÔLE DE LA PROLIFÉRATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES  
INTESTINALES**

**Par**

**Cathia Duchesne**

**Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire**

**Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (Maîtrise)  
en Biologie Cellulaire**

**Juillet 2003**



National Library  
of Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

Acquisitons et  
services bibliographiques

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 0-612-90598-5*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 0-612-90598-5*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this dissertation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de ce manuscrit.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the dissertation.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

**Canada**

## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	ii
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
RÉSUMÉ.....	xv

### CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1. L'INTESTIN.....	1
1.1. Anatomie et physiologie de l'intestin.....	1
1.2. L'axe crypte villosité.....	4
1.3. Épithélium intestinal et l'entérocyte.....	6
2. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DU RENOUVELLEMENT ÉPITHÉLIAL INTESTINAL	
2.1. Régulation du cycle cellulaire.....	8
2.1.1. Facteurs régulant le cycle cellulaire des cellules intestinales.....	9
2.1.2. Renouvellement épithélial et cycle cellulaire.....	9
2.1.3. Protéines régulatrices du cycle cellulaire : cyclines et CDKs.....	10
2.1.4. Inhibiteurs du cycle cellulaire.....	12
2.2. Voies de signalisation régularisant le renouvellement épithélial.....	14
2.2.1. La voie des MAPKs.....	15
2.2.2. La voie PI-3K/AKT.....	17

2.2.3. La voie $\beta$ -caténine/TCF.....	20
<b>3. LES TYROSINE PHOSPHATASES.....</b>	<b>26</b>
3.1. Les phosphatases à double spécificité.....	29
3.2. Les phosphatases lipidiques.....	29
3.3. Les tyrosine phosphatases classiques.....	30
3.3.1. Les tyrosine phosphatases de type récepteurs.....	30
3.3.2. Les tyrosine phosphatases cytoplasmiques.....	31
3.3.2.1. Les tyrosine phosphatases à domaines SH2.....	32
3.3.2.1.1. La tyrosine phosphatase SHP-2.....	33
3.3.2.1.2. La tyrosine phosphatase SHP-1.....	34
3.3.2.1.2.1. Régulation négative de la signalisation par SHP-1...	36
<b>4. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DU PROJET DE RECHERCHE.....</b>	<b>40</b>

## **CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES**

1. Matériel.....	42
2. Spécimens animaux et humains.....	43
3. Culture cellulaire.....	44
3.1. Les cellules HIEC.....	44
3.2. Les cellules Caco-2/15.....	44
3.3. Les cellules IEC-6.....	45



3.4. Les cellules HEK293.....	45
4. Immunofluorescence.....	46
4.1. Immunofluorescence indirecte sur cellules.....	46
4.2. Souris <i>motheaten</i> <sup>v</sup> suite à l'incorporation de Brdu.....	47
4.3. Immunofluorescence indirecte sur tissus humains.....	47
5. Immunobuvardage de type Western.....	48
5.1. Immunobuvardage sur lignées cellulaires.....	48
5.2. Immunobuvardage sur souris <i>me</i> <sup>v</sup> et contrôles.....	49
6. Immunoprécipitation.....	50
7. Dosage de l'activité phosphatase de SHP-1.....	51
8. Étude de liaison à l'ADN EMSA.....	52
9. Transfection transitoire.....	53
9.1. Vecteurs d'expression et gènes rapporteurs luciférase.....	53
9.2. Méthode de lipofection et essai luciférase.....	54
9.3. Transfection au phosphate de calcium.....	55
10. Double hybride.....	55
10.1. Vecteur de levures.....	56
10.2. Clonage de SHP-1 sauvage dans le vecteur pGBKT7.....	56
10.3. Transformation dans les levures.....	58
10.4. Vérification de l'expression de la protéine SHP-1 dans la levure.....	59
10.5. Test d'interaction avec la librairie de Caco-2/15 .....	60
10.6. Extraction de l'ADN des clones sélectionnés.....	61
10.7. Amplification et identification de l'ADN issu de la bibliothèque.....	62
11. Infection rétrovirale de SHP-1 sous le contrôle d'un promoteur inductible.....	63

11.1. Vecteurs d'expression.....	63
11.2. Clonage de SHP-1 sauvage et C/S dans le vecteur pRevTRE.....	66
11.3. Production du rétrovirus dans les cellules HEK293.....	67
11.4. Infection des cellules HIEC avec pRevTet-On et pRevTRE SHP-1WT et pRevTRE SHP-1C/S.....	68
12. Essai kinase CDK2.....	69

### CHAPITRE III : RÉSULTATS

1. Localisation de SHP-1 dans le colon et le jéjunum de l'intestin fœtal humain.....	70
2. Localisation de la protéine SHP-1 dans les lignées cellulaires épithéliales humaines et de rat aux stades prolifératif et après l'atteinte de la confluence.....	70
3. Analyse de l'expression et de l'activité de SHP-1 dans les cellules épithéliales intestinales durant l'arrêt du cycle cellulaire et lors de la différenciation.....	73
4. Régulation du cycle cellulaire des cellules intestinales par l'expression ectopique de SHP-1.....	77
5. Association entre SHP-1 et $\beta$ -caténine dans les cellules intestinales HIEC et IEC-6.....	82
6. Effet de la surexpression de SHP-1 sur la liaison à l'ADN du complexe $\beta$ -caténine/TCF.....	83
7. Déphosphorylation sur tyrosine de la $\beta$ -caténine par SHP-1.....	88
8. Analyse du rôle de la phosphorylation sur tyrosine de la $\beta$ -caténine.....	90
9. Effet de la surexpression de SHP-1 sur l'association de la $\beta$ -caténine avec la machinerie transcriptionnelle de base.....	94

10. Analyse du statut de la voie $\beta$ -caténine/TCF dans les souris <i>motheaten</i> <sup>v</sup> .....	96
11. Analyse de l'expression de la cycline D1 dans les populations inductibles SHP-1.....	101
12. Identification d'un nouveau partenaire de SHP-1 par double-hybride.....	103
13. Interaction entre SHP-1 et CDK2 dans les cellules épithéliales intestinales.....	105
14. Phosphorylation de SHP-1 par CDK2.....	107

## CHAPITRE IV : DISCUSSION

1. Implication de SHP-1 dans l'arrêt de prolifération des cellules épithéliales intestinales.....	111
2. Mécanismes d'action de SHP-1 dans l'arrêt de prolifération des cellules intestinales.....	114
3. Implication de SHP-1 dans la prolifération des populations inductibles pour SHP-1.....	121
4. Rôles potentiels de l'association entre SHP-1 et CDK2.....	123
5. Conclusions et perspectives.....	126

REMERCIEMENTS.....	130
--------------------	-----

BIBLIOGRAPHIE.....	131
--------------------	-----

## LISTE DE ILLUSTRATIONS

### CHAPITRE I : INTRODUCTION

Schéma 1.	Représentation des différentes parties de l'intestin.....	2
Schéma 2.	Représentation de l'axe crypte-villosité et des jonctions cellulaires de l'entérocyte.....	5
Schéma 3.	Régulation du cycle cellulaire.....	13
Schéma 4.	Cascade p42/p44 MAPKs.....	16
Schéma 5.	Voie de signalisation de la PI-3K.....	19
Schéma 6.	Voie de signalisation $\beta$ -caténine/TCF.....	24
Schéma 7.	Superfamille des tyrosine phosphatases.....	28
Schéma 8.	Structure et activation de la protéine tyrosine phosphatase SHP-1.....	35
Schéma 9.	Substrats connus de SHP-1.....	39

### CHAPITRE II : MATÉRIELS MÉTHODES

Schéma 10.	Vecteurs d'expression du système de double hybride.....	57
Schéma 11.	Principe de l'induction d'une protéine avec le système pRevTet-On.....	64
Schéma 12.	Vecteurs rétroviraux pour le système inductible .....	65

### CHAPITRE III : RÉSULTATS

Figure 1.	Localisation de SHP-1 dans l'intestin fœtal humain.....	71
Figure 2.	Localisation de SHP-1 dans les lignées cellulaires épithéliales intestinales humaines et de rat.....	72
Figure 3.	Expression de SHP-1 dans les lignées cellulaires en arrêt de prolifération.....	74
Figure 4.	Activité de SHP-1 dans les lignées cellulaires à différents jours de confluence...	75
Figure 5.	Effet de la surexpression ectopique de SHP-1 sauvage et dominant négatif sur les gènes rapporteurs <i>DHFR</i> , <i>cycline D1</i> , <i>c-myc</i> et <i>c-fos</i> dans les cellules HIEC.....	78
Figure 6.	Effet de la surexpression ectopique de SHP-1 sauvage et dominant négatif sur le gène rapporteur TOP-FLASH.....	81
Figure 7.	Association de SHP-1 et $\beta$ -caténine dans les cellules épithéliales intestinales.....	84
Figure 8.	Colocalisation de SHP-1 et de la $\beta$ -caténine dans les cellules IEC-6.....	85
Figure 9.	Liaison à l'ADN du complexe $\beta$ -caténine/TCF dans les cellules Caco-2/15 et dans les HEK 293 surexprimant SHP-1 sauvage et SHP-1 C/S.....	87
Figure 10.	Déphosphorylation de la $\beta$ -caténine par SHP-1 dans les cellules HEK 293.....	89
Figure 11.	Augmentation de l'activité transcriptionnelle de $\beta$ -caténine en réponse aux facteurs de croissance.....	91
Figure 12.	Phosphorylation sur tyrosine de la $\beta$ -caténine dans une cinétique de stimulation au sérum (FBS).....	93
Figure 13.	Association entre la $\beta$ -caténine et TBP dans les cellules HEK293 transfectées avec les constructions de SHP-1.....	95
Figure 14.	Niveau de phosphorylation de la $\beta$ -caténine dans les souris <i>motheaten</i> .....	97

Figure 15.	Expression de certains gènes de la voie $\beta$ -caténine/TCF dans les souris <i>motheaten<sup>v</sup></i> .....	99
Figure 16.	Mesure de la synthèse d'ADN dans les souris <i>motheaten<sup>v</sup></i> .....	100
Figure 17.	Inductibilité de l'expression de SHP-1 dans les populations HIEC .....	102
Figure 18.	Effet de l'induction de SHP-1 inductible sur l'expression de la cycline D1.....	104
Figure 19.	Association entre SHP-1 et CDK2 surexprimés dans les cellules HEK293.....	106
Figure 20.	Association entre SHP-1 et CDK2 endogènes dans les cellules épithéliales intestinales.....	108
Figure 21.	Phosphorylation spécifique de SHP-1 par CDK2 dans les HEK293.....	110

#### CHAPITRE IV : DISCUSSION

Figure 22.	Modèle hypothétique du rôle de SHP-1 dans le contrôle de la voie $\beta$ -caténine/TCF.....	122
------------	---	-----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN :	acide désoxyribonucléique
APC :	adénomateux polyposis coli
ATP :	adénosine triphosphate
Arg :	arginine
Asp :	asparagine
BCR :	B-cell antigen receptor
BSA :	bovine serum albumin (albumine de sérum bovin)
BrdU :	5-bromo-2'-désoxyuridine
°C :	degré celcius
CA :	constitutif actif
Caco :	cellules d'adénocarcinome de colon humain
CAK :	cyclin activating kinase
CBP :	CCAAT enhancer binding protein
CDK :	cyclin dependent kinase
Cdx1 :	caudal related 1
COX-1 :	cyclooxygénase-1
CKI:	inhibiteur des complexes cycline/CDK (cyclin-dependant kinase inhibitor)
CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
DHFR :	dihydrofolate réductase
DMEM :	milieu " Dulbecco modified Eagles's medium "

Dsh:	Dishevelled
DTT:	dithiothréitol
ECL:	Enhanced chemiluminescence
EDTA :	disodium éthylène diamide tétra acétique
EGF :	epidermal growth factor
EGTA:	acide éthylèneglycol-bis-( $\beta$ -aminoéthyléther)N,N,N',N'-tétraacétique
EPO:	érythropoïétine
FBS:	fetal bovin serum
GSK3- $\beta$ :	glycogène synthase kinase 3 $\beta$
h:	heures
HA :	hémagglutinine
HDAC :	histone désacétylase
HEK 293:	human embryonic kidney cells
HGF:	hepatocyte growth factor
HIEC:	human intestinal epithelial cells
IEC-6	rat intestinal epithelial cell
Il-3 $\beta$ :	interleukine-3 $\beta$
INF :	interféron
IRS-1	insuline receptor substrate-1
JAK:	Janus associated kinase
jr:	jour
Kda:	kilodalton



KGF:	keratinocyte growth factor
Lef-1:	Lymphocyte enhancer factor-1
LiCl:	chlorure de lithium
M:	Molaire
mM	Millimolaire
MAPKKK :	MAP kinase kinase kinase
MAPKK :	MAP kinase kinase
MAPK :	mitogen activated protein kinase
me <sup>v</sup> :	souris <i>motheaten</i> viable
me:	souris <i>motheaten</i>
MEK:	mitogen-extracellular kinase
MKP:	MAP kinase phosphatase
min:	minute
ml:	millilitre
MMP-7 :	métalloprotéinase-7
NaCl :	chlorure de sodium
NaF :	fluorure de sodium
NFκB:	nuclear factor Kappa B
ng:	nanogramme
Opti-MEM	optimum modified Eagles's medium
PBS:	phosphate buffer saline
PDGF:	platelet-derived growth factor
PDK-1	3-phosphatidyl-inositol-dependent protein kinase

PH:	pleckstrine homology domain
PI3K:	phosphatidylinositol-3 kinase
PKB:	protein kinase B
pmoles:	picomoles
PMSF:	phenylmethanesulfonyl fluoride
PNpp:	para-nitrophenyl phosphate
pRb:	protéine du rétinoblastome
PP2A :	protéine phosphatase 2A
PtdIns-3-P :	phosphatidylinositol-3-phosphate
PtdIns-3,4-P:	phosphatidylinositol-3,4 - biphosphate
PtdIns-3,4,5-P:	phosphatidylinositol-3,4,5 – triphosphate
Pro:	proline
PTK:	protéine tyrosine kinase
PTP:	protéine tyrosine phosphatase
rEGF:	récepteur du «epidermal growth factor »
rEpo:	récepteur à l'érythropoïétine
RTK :	récepteur à activité tyrosine kinase
Sec :	seconde
Ser :	sérine
SDS-page :	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SH :	src homology domain
TBP:	TATA binding protein
TCA:	trichloroacetic acid
TCF :	T-cell factor

TCR :	T cell antigen receptor
Thr:	thréonine
TRE:	tetracycline response element
µg:	microgramme
µm:	micromètre
µM:	micromolaire
VH1:	<i>vaccina virus</i> late H1 gene

## **RÉSUMÉ**

### **MÉCANISME D'ACTION DE LA TYROSINE PHOSPHATASE SHP-1 DANS LE CONTRÔLE DE LA PROLIFÉRATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES**

Par Cathia Duchesne

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine pour l'obtention du grade de  
Maîtrise ès science (M.Sc.) en biologie cellulaire.

La protéine tyrosine phosphatase SHP-1 est une phosphatase fortement exprimée dans les cellules hématopoïétiques et modérément dans plusieurs autres types cellulaires. Cette protéine possède deux domaines SH2 qui sont responsables de la reconnaissance sur d'autres protéines de sites comportant des tyrosines phosphorylées. SHP-1 est surtout connue pour son rôle négatif dans la prolifération et la signalisation des cellules hématopoïétiques. En effet, elle est rapportée pour médier négativement la signalisation en aval de l'IL-3 et de plusieurs autres récepteurs à cytokines. Bien que ses rôles dans les cellules d'origine hématopoïétique soient assez bien caractérisés, très peu de choses sont connues sur ses rôles dans les cellules épithéliales. Nous avons donc entrepris d'analyser le rôle de SHP-1 dans le renouvellement épithélial intestinal. Les résultats obtenus montrent que SHP-1 est fortement exprimée dans le noyau de toutes les cellules épithéliales intestinales de l'intestin fœtal humain; cependant, une plus forte expression est notée dans les cellules du haut de la crypte et du tiers inférieur de la villosité. L'expression ainsi que l'activité de SHP-1 sont augmentées dans les cellules Caco-2/15 confluentes et en cours de différenciation. La surexpression ectopique de SHP-1 dans les cellules cryptales intestinales HIEC inhibe de manière significative l'expression des gènes *dhfr*, *c-myc* et *cycline D1* sans interférer avec l'expression du gène *c-fos*. Nous avons également noté une inhibition de l'activité

transcriptionnelle du gène rapporteur TOP-FLASH, indicateur de l'activité du complexe  $\beta$ -caténine/TCF. Des études de co-immunoprécipitation et d'immunofluorescence nous ont permis d'identifier la  $\beta$ -caténine comme un partenaire d'interaction et de déphosphorylation de SHP-1 dans les cellules intestinales. La fonction de la phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine sur son activité transcriptionnelle a ensuite été investiguée. Les résultats révèlent que les facteurs de croissance agissant via des récepteurs à activité tyrosine kinase augmentent les capacités transcriptionnelles de la  $\beta$ -caténine visualisées par TOP-FLASH. Dans les souris *motheaten*<sup>y</sup>, une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine corrèle avec l'induction des gènes c-myc et cycline D1. Nous avons ensuite tenté de mettre en lumière le mécanisme d'action de SHP-1 dans l'inhibition de la voie  $\beta$ -caténine/TCF. Bien que SHP-1 n'interfère pas avec la capacité de liaison à l'ADN du complexe  $\beta$ -caténine/TCF, elle diminue par contre l'association entre la  $\beta$ -caténine et TBP, une protéine essentielle au recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base. Des études entreprises dans des populations stables surexprimant SHP-1 sous le contrôle d'un promoteur inductible confirment également le rôle négatif de SHP-1 dans la prolifération des cellules épithéliales intestinales. En résumé, nos résultats démontrent que SHP-1 contrôle négativement la prolifération des cellules épithéliales intestinales en interférant avec l'activité transcriptionnelle du complexe  $\beta$ -caténine/TCF. Nous pensons que SHP-1 diminue la transcription des gènes cibles du complexe  $\beta$ -caténine/TCF en déphosphorylant un résidu tyrosine de la  $\beta$ -caténine essentiel pour son association avec TBP et le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base. Ceci mènerait à une inhibition de la transcription des gènes cibles de la voie et à la diminution de la prolifération. Finalement, par double hybride, nous avons identifié CDK2 comme un partenaire d'interaction potentiel de SHP-1 dans les cellules intestinales. En conclusion, nous postulons que SHP-1 régularise

négativement la prolifération des cellules épithéliales intestinales en inhibant l'activité du complexe  $\beta$ -caténine/TCF et peut-être également en modulant l'activité de CDK2, une kinase jouant un rôle clé dans la progression du cycle cellulaire

# **CHAPITRE I**

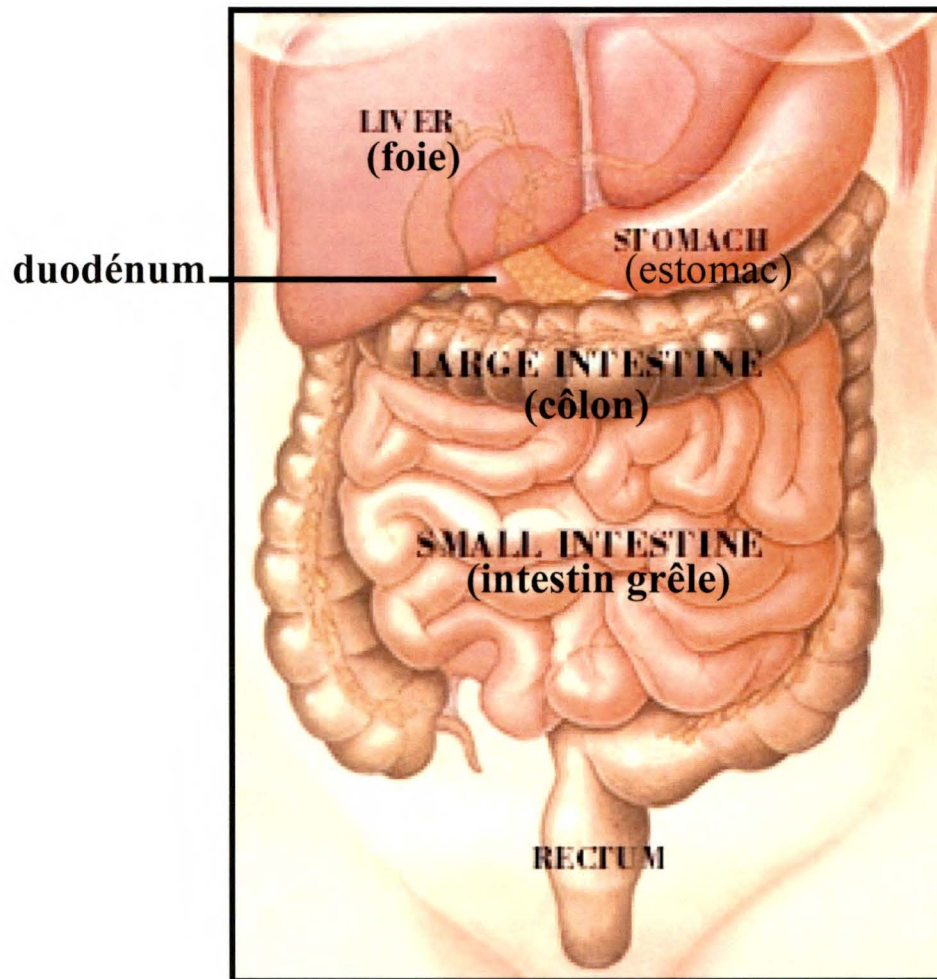
## **INTRODUCTION**

### **1. L'INTESTIN**

#### **1.1. Anatomie et physiologie de l'intestin**

C'est après avoir séjourné quelques temps dans l'estomac que la nourriture, partiellement digérée par les enzymes gastriques, est relâchée peu à peu dans l'intestin afin d'y subir des transformations moléculaires majeures. De façon générale, l'intestin se divise en 2 parties bien distinctes : l'intestin grêle et le côlon (schéma 1).

L'intestin grêle est le principal organe de la digestion et de l'absorption. Ce dernier est lui-même divisé en 3 parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le duodénum, le plus court et le plus proximal de ces segments, occupe un rôle prépondérant dans les processus digestifs. Il s'agit de la partie de l'intestin où sont déversées les enzymes pancréatiques telles le trypsinogène, la lipase, le chymotrypsinogène ainsi que les acides biliaires en provenance de la vésicule biliaire. Pourvus d'actions multiples, ces différents sucs permettront une digestion sommaire des macromolécules en fragments beaucoup plus accessibles par les autres enzymes présentes dans les portions subséquentes de l'intestin. Par des contractions péristaltiques successives, la nourriture partiellement digérée est ensuite acheminée vers le jéjunum, puis poursuit sa progression vers l'iléon.



### **Schéma 1. Représentation des différentes parties de l'intestin.**

Les différents segments du système digestif figurent dans l'illustration suivante. D'abord, on retrouve l'estomac, dont le contenu sera déversé dans le duodénum. Il poursuit ensuite sa progression dans l'intestin grêle et le côlon pour être expulsé par le rectum.

Tiré et modifié de [kidshealth.org/parent/medical/digestive/ibd.html](http://kidshealth.org/parent/medical/digestive/ibd.html)



L'intestin grêle est parfaitement adapté à la digestion et à l'absorption des nutriments. Non seulement sa longueur considérable offre une surface étendue de contact avec les nutriments, mais les modifications structurales que présente sa paroi y contribuent fortement. En effet, elle est composée de nombreuses projections nommées villosités intestinales faisant saillie dans la lumière. À la base de chacune de ces saillies se trouvent des dépressions : les cryptes intestinales ou cryptes de Liberkühn. Les villosités sont recouvertes d'un épithélium cylindrique constitué principalement de cellules absorbantes appelées entérocytes dont le côté apical se termine par des microvillosités. Ces dernières forment une structure floue portant le nom de bordure en brosse (Marieb, 1993). C'est dans ces microvillosités que se retrouvent exprimées de multiples enzymes digestives dont bon nombre de dissacharidases et peptidases. Plusieurs types de transporteurs de sucres, d'acides aminés et de lipides y sont également associés. La présence des microvillosités s'avère donc importante pour une augmentation de la surface de contact entre les nutriments et la muqueuse intestinale contribuant à une efficacité accrue de la digestion et de l'absorption.

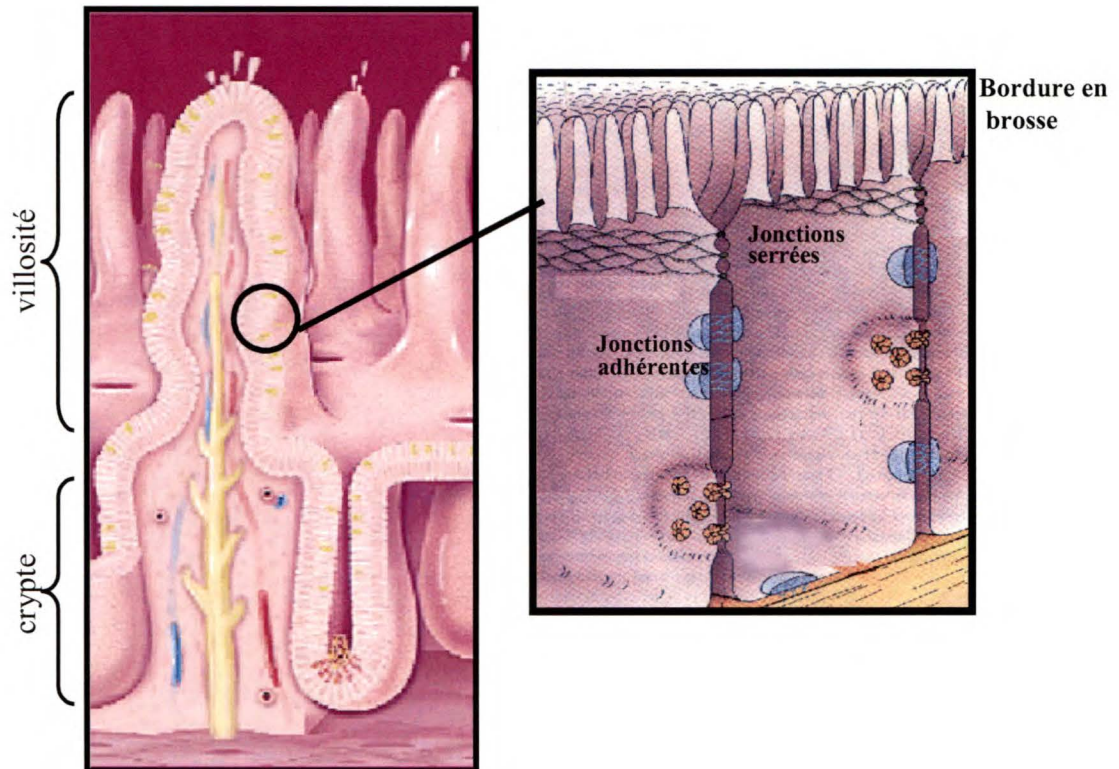
Morphologiquement, le côlon se distingue de l'intestin grêle par l'absence totale de villosités. Il se compose principalement de cryptes très profondes et très nombreuses. Comme la plus grande partie de la nourriture est absorbée avant d'atteindre le côlon, l'épithélium de ce dernier est limité dans l'expression d'enzymes digestives. Il renferme cependant de nombreuses cellules sécrétrices de mucus ou cellules caliciformes qui facilitent le passage du contenu colique lors de sa progression vers le canal excréteur ou rectum. Pour leur part, les cellules absorbantes du côlon, appelées colonocytes, sont

surtout spécialisées dans la réabsorption de l'eau, mais aussi dans l'absorption de vitamines et d'électrolytes.

## 1.2. L'axe crypte villosité

La muqueuse intestinale se compose de deux régions distinctes, qui ensemble, forment l'axe crypte-villosité, l'unité fonctionnelle de l'intestin. La crypte ainsi que la villosité sont tapissées d'une monocouche de cellules cylindriques formant l'épithélium intestinal (Podolsky et Babyasky, 1995). À partir de cellules souches, confinées à la base des cryptes, origine une population de cellules indifférenciées et prolifératives. Par un processus de division asymétrique (Bach et al., 2000), les cellules-filles, issues des divisions des cellules souches, migrent vers le haut de la crypte. Pendant cette migration, ces dernières perdent graduellement leur potentiel prolifératif au profit d'une différenciation terminale. Puis, poursuivant leur migration, les cellules ayant atteint l'extrémité de la villosité sont exfoliées dans la lumière par l'induction de la machinerie apoptotique. C'est ainsi que tous les 3 à 5 chez l'humain, l'épithélium intestinal est entièrement renouvelé (Wheater et al., 1988) (schéma 2).

La population de cellules souches de la crypte intestinale peut donner naissance à 4 types cellulaires bien distincts. C'est d'ailleurs grâce à cette caractéristique peu commune que les cellules souches intestinales sont dites pluripotentes (Bach et al., 2000). D'abord, les cellules absorbantes ou entérocytes, constituant le type cellulaire le plus important de l'intestin grêle, sont principalement responsables de l'absorption et de la digestion des



**Schéma 2. Représentation de l'axe crypte-villosité et des jonctions cellulaires de l'entérocyte.**

La muqueuse intestinale est tapissée de villosités faisant saillie dans la lumière intestinale. À la base des villosités sont retrouvées les cryptes. L'axe crypte-villosité est recouvert d'un épithélium composé d'entérocytes. Ces derniers adhèrent fortement entre eux à l'aide de structures nommées jonctions serrées et adhérentes.

Cleveland Clinic Foundation [www.nature.com/ni/journal/v1/n2/fig\\_tab/ni0800\\_99\\_F1.html](http://www.nature.com/ni/journal/v1/n2/fig_tab/ni0800_99_F1.html)

nutriments. Viennent ensuite les cellules entéroendocrines, surtout impliquées dans la sécrétion de grandes quantités d'hormones digestives peptidiques alors que la production de mucus intestinal est, quant à elle, assurée par les cellules caliciformes. Un quatrième type cellulaire origine également des cellules souches intestinales, il s'agit des cellules de Paneth. Contrairement aux autres types cellulaires exerçant leurs fonctions le long de la villosité, les cellules de Paneth migrent, pour leur part, vers le fond de la crypte pour y jouer un rôle zymogénique.

### 1.3. Épithélium intestinal et l'entérocyte

L'épithélium intestinal constitue l'une des principales interfaces entre le corps et l'environnement externe. Le feuillet de cellules épithéliales doit donc, en plus d'accomplir ses fonctions digestives, être pourvu de mécanismes lui permettant de jouer un rôle de barrière entre le contenu de l'intestin et la circulation sanguine (schéma 2).

La cellule absorbante mature ou entérocyte se distingue par la présence de structures lui permettant d'accomplir parfaitement ses fonctions digestives, mais également ses fonctions de barrière épithéliale. Fortement polarisée, celle-ci comporte un domaine apical, ainsi qu'un domaine basolatéral. Décrite pour la première fois en 1965 (Ito, 1965 ; Massey-Haroche, 2000), la bordure en brosse, située du côté apical de l'entérocyte se compose de plusieurs microvillosités. Ces dernières se spécialisent dans l'expression de nombreuses enzymes digestives incluant des peptidases et des disaccharidases telles la sucrase-isomaltase (Gordon et Herminston, 1994).

Les cellules formant le feuillet épithélial intestinal doivent interagir fortement entre elles. Ceci, dans le but d'assurer la cohésion nécessaire au maintien de l'intégrité et de la solidité de l'épithélium. Dans l'intestin, l'épithélium doit également jouer un rôle de barrière en empêchant à la fois le passage de substances solubles et d'agents pathogènes contenus dans la lumière. Les jonctions serrées sont justement des structures assurant ces fonctions (schéma 2). En liant fortement les entérocytes entre eux, elles constituent une barrière imperméable empêchant même le passage de très petites molécules. Cependant, cette perméabilité est modulable puisque des ions ainsi que certaines molécules peuvent parfois franchir cette barrière (Tsukita et Furuse, 2002). Les jonctions serrées préviennent également le mélange des composantes apicales et basolatérales comme les lipides et les protéines (Braga, 2002). Elles déterminent donc la polarité cellulaire des entérocytes. La formation des jonctions serrées est rendue possible grâce à des interactions homophiliques spécifiques entre des protéines transmembranaires exprimées à la surface de deux cellules voisines : les claudines. Reliées au cytosquelette d'actine intracellulaire via un complexe multiprotéique, ces dernières sont également un lieu de recrutement de plusieurs molécules de signalisation (Braga, 2002).

Un autre type de jonction cellulaire permet également l'adhésion des cellules intestinales entre elles. Constituant le type de jonctions cellulaires le plus répandu dans les épithéliums, les jonctions adhérentes occupent des fonctions aussi variées que le maintien de l'architecture tissulaire, de la polarité cellulaire et le contrôle de la prolifération ainsi que la différenciation (Conacci-Sorrell et al., 2002 ; Herminston et

Gordon, 1995) (schéma 2). L'assemblage de ces jonctions est médié par des interactions homophiliques dépendantes du calcium entre les domaines extracellulaires des cadhérines à la surface des cellules voisines. Leurs domaines intracellulaires sont, quant à eux, associés aux caténines ( $\gamma$ ,  $\alpha$ , et  $\beta$ ) et reliés au cytosquelette d'actine via la protéine  $\alpha$ -caténine. L'assemblage des complexes cadhérines-caténines à l'actine est donc un élément essentiel à la stabilisation des interactions cellules-cellules (Braga, 2002). Les fonctions des cadhérines ne se limitent pas seulement à l'établissement de jonctions adhérentes stables. Au contraire, elles peuvent également participer à différentes voies de signalisation importantes pour la différenciation, la prolifération et la migration (Conacci-Sorrell et al., 2002).

## **2. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DU RENOUVELLEMENT ÉPITHÉLIAL INTESTINAL.**

### **2.1. Régulation du cycle cellulaire**

En équilibre constant entre la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire, l'épithélium intestinal constitue le système idéal pour l'étude du cycle cellulaire. Les cellules-filles issues de la prolifération des cellules souches, prolifèrent rapidement pour ensuite arrêter leur cycle cellulaire et enclencher un processus de différenciation entérocytaire. L'arrêt de prolifération est donc finement relié à la différenciation dans l'épithélium intestinal (Stappenbeck et al., 1998).

### 2.1.1. Facteurs régulant le cycle cellulaire des cellules intestinales

Les cellules intestinales sont des cellules à renouvellement extrêmement rapide. Les facteurs régulant ce processus ne sont que partiellement connus jusqu'à maintenant. Cependant, il est largement accepté que certains facteurs de croissance, hormones et cytokines jouent un rôle très important dans la prolifération des cellules intestinales et ce, de manière endocrine, paracrine et autocrine. L'EGF (epidermal growth factor), le TGF $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ), les peptides en forme de trèfles (TFII, TF III), l'HGF (hepatocyte growth factor), le KGF (keratinocyte growth factor) le TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) et certains facteurs Wnt ne sont que quelques-uns des facteurs de croissance fortement exprimés dans l'intestin et connus pour participer au contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules de l'épithélium intestinal (Murphy, 1998).

### 2.1.2. Renouvellement épithélial et cycle cellulaire des cellules intestinales

La fine régulation du cycle cellulaire constitue un élément important dans le renouvellement épithélial. Il se compose principalement de 5 phases bien caractérisées soient G0, G1, S, G2, M.

Après l'ajout de facteurs de croissance sur des cellules quiescentes (phase G0), ces dernières entreprennent leur progression dans le cycle cellulaire par le début de la phase G1. Permettant à la cellule de doubler son contenu protéique ainsi que sa masse,

cette phase prépare également les cellules à répliquer leur ADN. C'est durant celle-ci que seront induites différentes protéines impliquées dans la transcription d'ADN et dans la synthèse de nucléotides. Lorsque les cellules ont complété la phase G1, elles progressent ensuite vers la phase S, la phase de synthèse d'ADN. La réplication de l'ADN permet la duplication du contenu en ADN de la cellule qui passe de 2N à 4N. Il s'agit d'un processus complexe au cours duquel plusieurs erreurs peuvent survenir. C'est pourquoi les cellules doivent être pourvues de mécanismes leur permettant de vérifier et corriger les défauts accumulés par la réplication. La phase G2, aussi surnommée la phase de réparation de l'ADN ou de préparation à la mitose, constitue l'étape où la cellule effectue les corrections nécessaires avant la dernière phase, celle de la mitose. Cette dernière permet la formation de deux cellules-filles à partir d'une seule cellule. Elle se divise elle-même en quatre phases soient la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (schéma 3).

### 2.1.3. Protéines régulatrices du cycle cellulaire : cyclines et CDKs

La progression à travers les différentes phases du cycle cellulaire est hautement régulée. Elle est en partie assurée par une famille de sérine-thréonine kinases appelées kinases dépendantes des cyclines (cycline dependent kinase, CDK), dont 7 isoformes sont caractérisés: CDK1, CDK2, CDK4-6, CDK3, CDK5 et CDK7. L'activité de ces complexes est entièrement dépendante de leur association avec leur sous-unité régulatrice: les cyclines, puis de leur phosphorylation par la CAK (kinase activatrice des CDKs) (Sherr, 1994). L'expression des cyclines, comme leur nom l'indique, est cyclique



et, à chaque phase du cycle cellulaire, est associée une cycline. Jusqu'à maintenant, plusieurs types de cyclines ont été identifiés. Parmi celles-ci on retrouve les cyclines A (1,2,3), B (1,2), C, D(1,2,3), E, F, G et H. Leur expression détermine donc l'ordre d'activation des CDKs et permet la progression d'une phase à une autre (Pines et al., 1993).

L'une des étapes déterminantes dans la progression en phase G1 du cycle cellulaire est le passage du point de restriction. Celui-ci est assuré par l'association successive des cyclines D avec leur sous-unité catalytique CDK4 ou CDK6 suivie de près de l'association de la cycline E avec CDK2. La formation de ces complexes assure la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome Rb (p105Rb). Identifiée à partir de tumeur de rétine (Classon et Harlow, 2002), elle occupe un rôle prédominant dans la progression de la phase G1 du cycle. Sous sa forme active, hypophosphorylée, pRb séquestre les facteurs de transcription E2F(1,2,3)/DP qui contrôlent l'expression de gènes codant pour les protéines impliquées dans la progression en phase S. Sa phosphorylation par les complexes cycline D/CDK4-6 et cycline E/CDK2 inactive pRb qui sous cette forme, libère les facteurs de transcription E2F. Ceci entraîne l'expression d'enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN (polymérase  $\alpha$ , thymidine kinase et la dihydrofolate réductase) ainsi que d'autres protéines nécessaires à l'entrée en phase S (La Thangue, 1994). L'hyperphosphorylation de Rb ainsi que la libération des facteurs de transcription E2F, déterminant l'entrée en phase S, dépendent presque exclusivement des facteurs de croissance. Cependant, une fois cette étape franchie, les cellules progressent automatiquement dans la phase S et ce, même en absence complète de signaux mitogènes

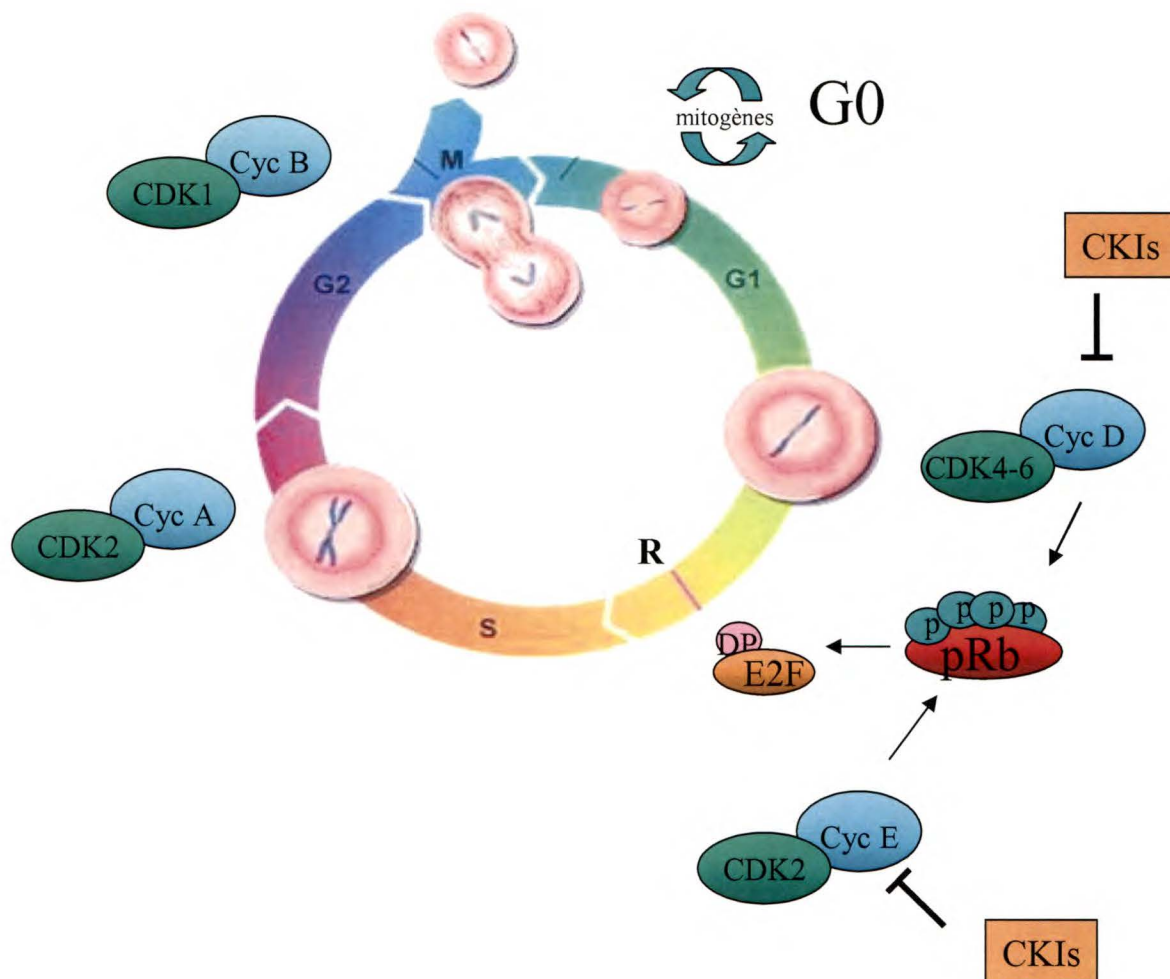
dans le milieu extracellulaire. On appelle point de non retour ou de restriction, le point en phase G1 tardive où les cellules deviennent indépendantes des signaux mitogéniques extérieurs (schéma 3) (Pardee, 1989).

Plusieurs mécanismes permettent à la cellule de régulariser l'activité des complexes cyclines/CDKs. Bien sûr, la dégradation des cyclines constitue un moyen efficace afin de prévenir leur activité. De plus, une phosphorylation sur la CDK, amenée par les kinases Wee1 ou Mic, peut résulter en l'inactivation du complexe (Morgan, 1997). Cependant, le moyen le plus efficace développé par la cellule pour inactiver les complexes demeure sans conteste les inhibiteurs du cycle cellulaire.

#### 2.1.4. Inhibiteurs du cycle cellulaire

L'activité des complexes cycline/CDK peut être modulée par des protéines appelées CKIs (Cyclin-Dependent kinase Inhibitor). Ces derniers sont regroupés en 2 familles selon leur mode d'action et selon leurs cibles.

D'abord, on retrouve la famille des INK4. En liant la sous-unité catalytique CDK4/6, ces petites protéines de 15-20kDa préviennent l'assemblage du complexe cycline D-CDK4/6. Les membres de cette famille comprennent  $p15^{\text{INK4B}}$ ,  $p16^{\text{INK4A}}$ ,  $p18^{\text{INK4C}}$  et  $p19^{\text{INK4D}}$ . Leur expression est dépendante de situations cellulaires particulières. Par exemple, le  $\text{TGF}\beta$ , un agent antimitogénique, induit fortement  $p15$ , menant ainsi un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Reynisdottir et Massague, 1997).



### Schéma 3. Régulation du cycle cellulaire.

Suite à une stimulation par des mitogènes, la cellule en G0 entreprend une progression en phase G1 du cycle cellulaire. Durant celle-ci, les complexes cycline/CDK activés phosphorylent la protéine pRb qui, une fois hyperphosphorylée, libère les facteurs de transcription E2F/DP. L'activité des complexes cycline/CDK peut être inhibée par les inhibiteurs du cycle cellulaire CKIs. La cellule passe ensuite le point de restriction pour entrer dans la phase S, où la cellule double son contenu en ADN. Vient ensuite la phase G2, caractérisée par une réparation de l'ADN. La cellule se divise ensuite en deux cellules-filles durant la mitose (M) complétant ainsi le cycle cellulaire.

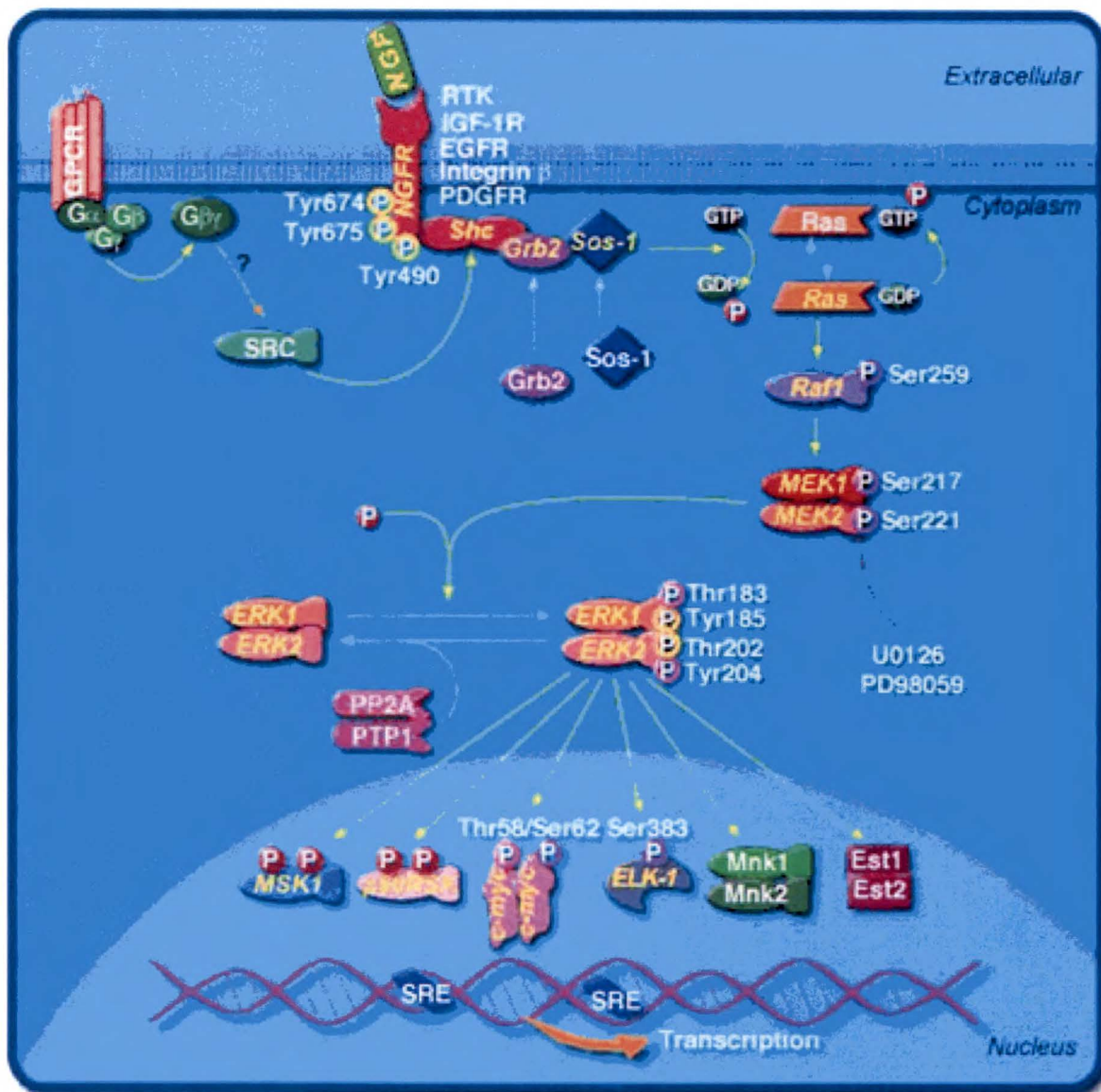
Les inhibiteurs Cip/Kip constituent, pour leur part, la deuxième famille d'inhibiteurs. Ces derniers, contrairement aux inhibiteurs de la famille des INK4, se lient directement au complexe cycline/CDK assemblé et empêche leur action. Ils exercent aussi bien leurs fonctions sur les complexes cycline D/CDK4-6 que sur les complexes formés par les autres combinaisons comme cycline E/CDK2, cycline A/CDK2 et cycline B/CDK1. On compte, parmi les membres de cette famille, les protéines p21Cip/Waf, p27Kip1, p57Kip2. Ces inhibiteurs sont induits en réponse à des stimuli extracellulaires aussi multiples que le stress osmotique ou thermique, les dommages à l'ADN, les irradiations, le TGF $\beta$  et lors de contacts cellules-cellules. De plus, de fortes inductions de ces inhibiteurs ont été rapportées comme responsables de l'arrêt de prolifération observée lors de la sénescence et de la différenciation. Dans l'intestin, notre groupe a démontré que ces trois inhibiteurs coopèrent dans l'inhibition du cycle cellulaire des cellules déterminées à se différencier (Deschênes et al., 2001).

## 2.2. Voies de signalisation régularisant le renouvellement épithélial intestinal

Depuis les dernières années, une grande importance a été accordée à la façon dont les facteurs de croissance transmettent leurs signaux vers l'intérieur de la cellule. Dans l'épithélium intestinal, au moins 3 voies de signalisation semblent cruciales pour la progression du cycle cellulaire : la voie Ras-Raf-MAPK, la voie PI-3K/AKT et la voie  $\beta$ -caténine/TCF.

### 2.2.1. La voie des MAPKs

Les premières évidences de l'existence des MAPKs (mitogen-activated-protein-kinase) sont survenues en 1987. Suite à une stimulation d'adipocytes à l'insuline, Ray et Sturgill (1987) ont identifié deux protéines de 42 et 44 KDa dont l'activité sérine/thréonine kinase était fortement induite. Aujourd'hui, la voie des MAPKs est considérée comme un important transducteur des signaux mitogéniques suivant la liaison des facteurs de croissance ou d'hormones à leurs récepteurs. Dans les cellules de mammifères, l'activité sérine/thréonine de MAPKs peut être induite à la fois par des récepteurs couplés aux protéines G et par les récepteurs à activité tyrosine kinase. Il existe une voie classique d'activation des MAPKs et cette dernière implique la participation de la petite protéine G membranaire Ras. Sous sa forme active, c'est-à-dire liant le GTP, elle permet le recrutement et l'activation de la MAPKKK Raf au niveau de la membrane plasmique. Cet événement stimule les MAPKKs MEK1 et MEK2. L'activation de ces dernières amène une double phosphorylation des p42/p44 aussi appelées ERK1/ERK2 (schéma 4). Suite à leur activation, les MAPKs sont transloquées au noyau où elles possèdent des cibles multiples. Là, elles phosphorylent différents facteurs de transcription menant à leur activation. Parmi les cibles nucléaires des MAPKs, on retrouve des facteurs de transcription tels Elk-1/TCF (Gille et al. 1992), c-myc (Seth et al., 1992) et ATF2 (Marais et al., 1993). Il existe également certaines cibles phosphorylées par les MAPKs avant leur entrée dans le noyau, comme le récepteur à l'EGF (Northwood et al., 1991) et la kinase p90<sup>RSK</sup> (Blenis, 1993).



#### Schéma 4. Cascade p42/p44 MAPKs.

Suivant une activation de récepteurs couplés aux protéines G ou à activité tyrosine kinase, le complexe composé de Shc/Grb-2/SOS-1 est activé permettant le recrutement de la petite protéine G Ras. Sous sa forme liant le GTP, Ras stimule l'activité de Raf, qui elle active par phosphorylation les kinases MEKs ayant comme substrat p42/p44 MAPK (ERK1/ERK2). Celles-ci transloquent ensuite vers le noyau où elle possèdent des cibles multiples impliquées dans la transcription.

Tiré de [www.biocarta.com](http://www.biocarta.com)

Peu importe la nature du stimulus extracellulaire, la plupart des mitogènes mènent à l'activation des MAPKs. Cependant, seule leur activation soutenue et biphasique peut conduire à une entrée des cellules dans le cycle cellulaire (Pagès et al., 1993). Dans les cellules cryptales intestinales de rat IEC-6, la stimulation des MAPKs est nécessaire à la baisse d'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27 et à leur entrée en phase S du cycle (Rivard et al., 1999). Aussi, il a été rapporté que l'activation des MAPKs était nécessaire à la prolifération des cellules intestinales induite par GLP-2 (Jasleen et al., 2000) et par la l'angiotensine (Chiu et al., 2003). Il a également été démontré que l'action des p42/p44 MAPKs permet la transcription de la cycline D1 dans les fibroblastes (Lavoie et al., 1996). Il ne fait donc aucun doute qu'elles jouent un rôle crucial dans la progression du cycle cellulaire. Cependant, bien qu'elles semblent très importantes pour la prolifération cellulaire, notre groupe a récemment démontré que les MAPKs seraient également impliquées dans l'expression de protéines reliées à la différenciation entérocytaire (Aliaga et al., 1999).

#### 2.2.2. La voie PI-3K/AKT

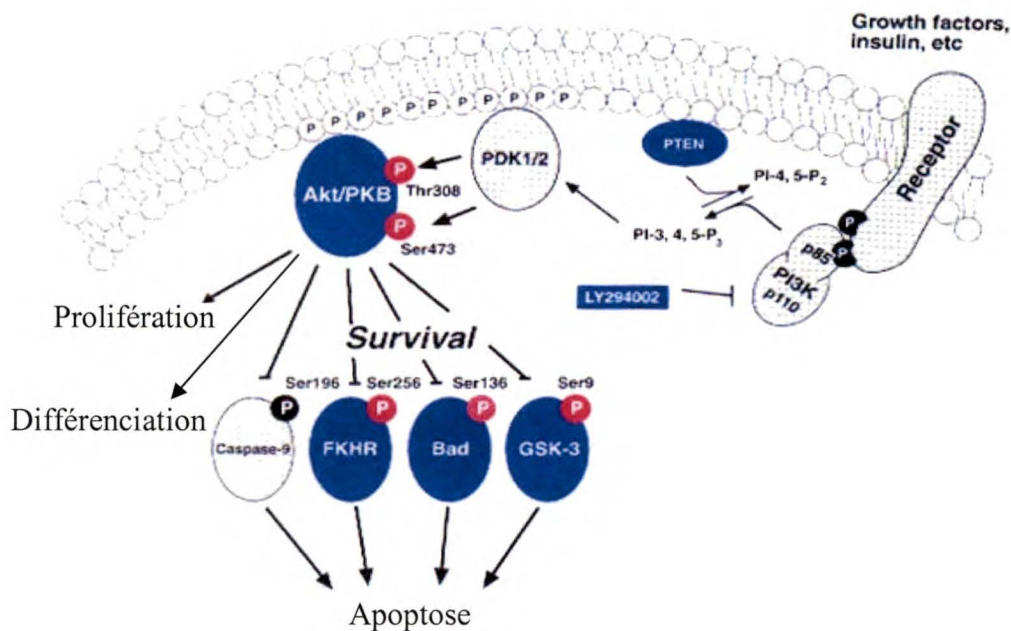
Les PI-3K (phosphatidylinositol-3 kinase) sont des protéines qui peuvent phosphoryler la position 3 des lipides phosphatidylinositols (PtdIns). Leur activité kinasique résulte en la formation de lipides membranaires multiples PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub>. Généralement, ces lipides sont absents ou en très faible quantité à la membrane des cellules, mais suite à une stimulation via différents récepteurs, leur concentration augmente drastiquement. Les PI-3K sont classées en

différentes familles selon leur spécificité de substrat ainsi que leur mode de régulation. La classe 1A, constituée d'une sous-unité catalytique de 110KDa et d'une sous-unité régulatrice de 85KDa, possède 2 domaines SH2 lui permettant d'interagir avec différents récepteurs à activité tyrosine kinase.

Suite à la formation des PtdIns(3,4)P et PtdIns(3,4,5)P<sub>2</sub> par la PI-3K, plusieurs protéines sont recrutées à ces lipides via leur domaine PH (pleckstrin homology). C'est le cas entre autres de la protéine kinase AKT également connue sous le nom de PKB. Le recrutement de AKT/PKB à la membrane plasmique permet sa phosphorylation rapide par la kinase PDK-1 ainsi que son activation. Ce n'est qu'une fois activée que AKT peut phosphoryler bon nombre de protéines impliquées dans le métabolisme du glucose, la prolifération, la transcription et la survie cellulaire (Datta et al., 1999) (schéma 5).

Les implications de la voie PI-3K/AKT sont multiples en ce qui concerne la prolifération cellulaire. En effet, l'activation soutenue de cette voie est suffisante à promouvoir l'entrée en phase S des fibroblastes (Klippel et al., 1998). D'autre part, son inhibition parvient à induire un arrêt du cycle cellulaire en provoquant un état semblable à la sénescence ainsi qu'une augmentation de l'expression de p27 (Collado et al., 2000). Plusieurs évidences suggèrent également que la voie PI-3K/AKT pourrait être impliquée dans la progression tumorale des cancers colorectaux ainsi que dans l'inflammation intestinale (Weaver et Ward, 2001). Ceci est confirmé par le fait que les souris PTEN<sup>+/-</sup>, souris hétérozygotes pour la phosphatase PTEN qui enlève spécifiquement le phosphate ajouté par la PI-3K, développent des polypes intestinaux (Chi et al., 1998).





### Schéma 5. Voie de signalisation de la PI-3K.

La PI-3K est recrutée via ses domaines SH2 suite à la stimulation d'un récepteur à activité tyrosine kinase. En créant des PtdIns phosphorylés en position 3, la PI-3K permet le recrutement à la membrane plasmique de AKT puis de son activation par PKD. Une fois activée, AKT intervient dans plusieurs processus cellulaires dont la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire et l'apoptose.

Tiré et modifié du catalogue de Cell Signaling 2001

Dernièrement, plusieurs études tendent à démontrer des rôles de la voie PI-3K/AKT dans la différenciation. Dans les cellules musculaires, son activation semble importante pour la fusion des myoblastes en myotubes (Jiang et al., 1998). Au niveau de l'intestin, notre groupe a montré un rôle central joué par la PI-3K dans l'assemblage des jonctions adhérentes et dans l'induction de la différenciation entérocytaire morphologique et fonctionnelle (Laprise et al., 2002).

### 2.2.3. La voie $\beta$ -caténine/TCF

À la base, la  $\beta$ -caténine est une protéine surtout connue pour son rôle d'adhésion en participant, avec la E-cadhérine, à la formation des jonctions adhérentes (Pokutta et Weis, 2002). Cependant, depuis une dizaine d'années, il a été établi qu'elle pouvait agir en tant que molécule de signalisation dans le noyau. En 1987, Wieschaus et Riggleman ont montré que l'injection de la  $\beta$ -caténine dans des embryons de *Drosophila* provoquait une duplication de l'axe antéro-postérieure. Cette expérience constituait l'une des premières évidences démontrant le caractère multifonctionnel de la  $\beta$ -caténine.

La  $\beta$ -caténine est en effet une protéine aux fonctions diverses. Au niveau de la membrane plasmique, on la retrouve dans un complexe comprenant la E-cadhérine et  $\alpha$ -caténine et  $\gamma$ -caténine. La formation des ces complexes adhérents peut être régulée par phosphorylation sur tyrosine. Il est d'ailleurs fréquent d'observer une

association physique de tyrosine kinases et phosphatases avec les complexes caténine-cadhérine (Muller, 1999). Par exemple, la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine sur tyrosine par v-src ou par des récepteurs à activité tyrosine kinase tels rHGF (c-MET) ou rEGF provoque sa dissociation des jonctions adhérentes (Monga et al., 2002 ; Ly et al., 2001). Cette dissociation permet le transfert de la  $\beta$ -caténine dans le cytosol, où elle se retrouve sous sa forme monomérique soluble (Morin, 1999). Il est aussi rapporté qu'une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine ainsi que sa dissociation de la E-cadhérine corrèle avec une augmentation de l'invasion cellulaire (Behrens et al., 1993).

C'est au niveau du cytosol que la  $\beta$ -caténine a la possibilité d'être dégradée ou de transloquer vers le noyau. En absence de signaux cellulaires, la stabilité cytosolique de la  $\beta$ -caténine est contrôlée par un complexe multiprotéique formé par l'axine, la glycogène synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) et le suppresseur de tumeur APC. Ayant une fonction d'échafaudage, l'axine sert d'ancrage à APC, GSK3 $\beta$  et à la  $\beta$ -caténine. Cette association est essentielle à la phosphorylation par GSK3 $\beta$  de la  $\beta$ -caténine sur des résidus sérine/thréonine en N-terminal de la protéine. La phosphorylation spécifique de ces résidus entraîne la reconnaissance de la  $\beta$ -caténine par le complexe SCF contenant la boîte F  $\beta$ -TrCP, permettant ainsi l'ubiquitinylation de la protéine et sa dégradation via la machinerie protéosomale (Aberle, 1997).

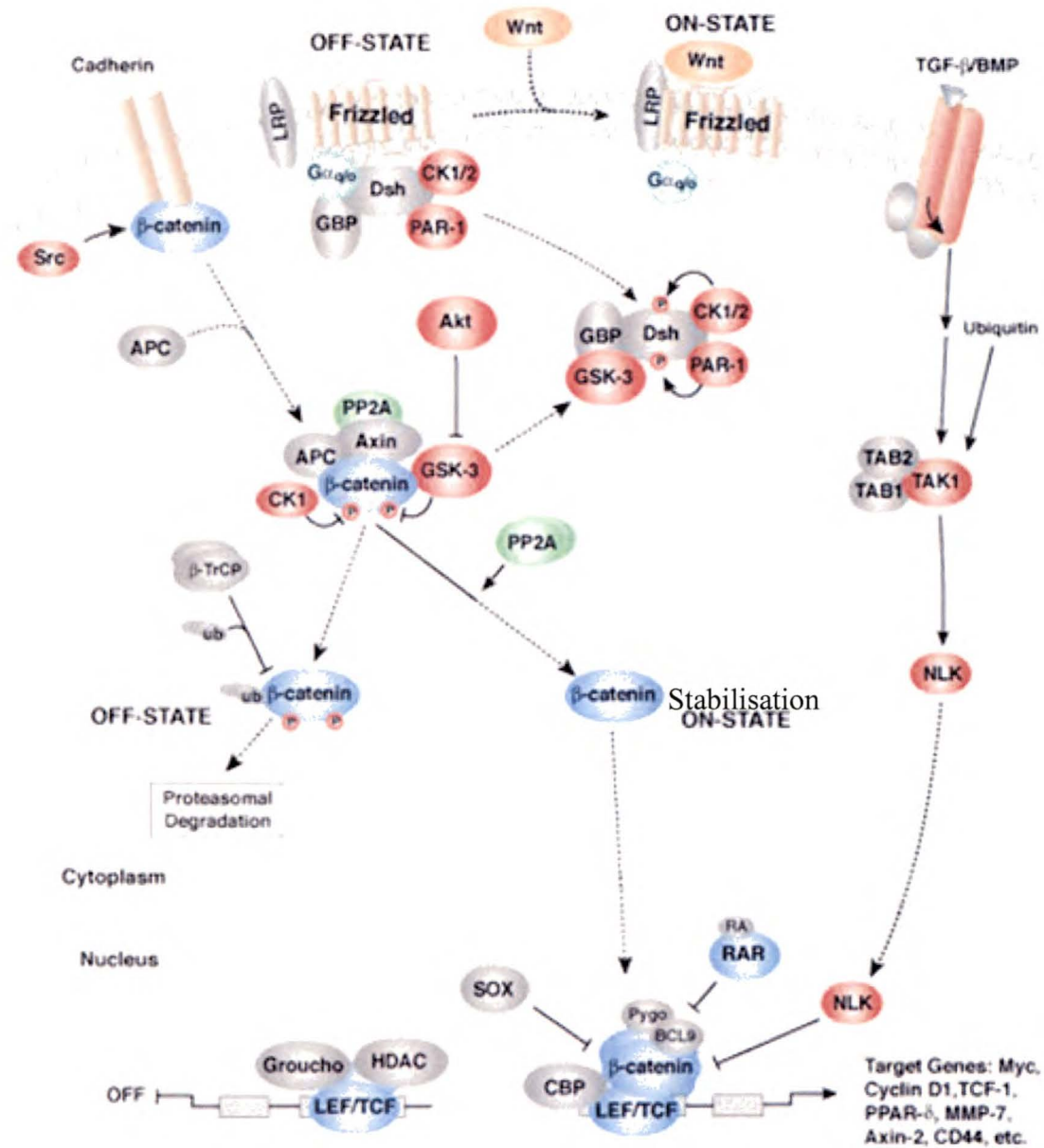
Bien que GSK3 $\beta$  semble impliquée dans le contrôle de la stabilité de la  $\beta$ -caténine, elle n'est cependant pas la seule à assurer cette fonction. Le suppresseur de

tumeur APC occupe également des rôles majeurs dans ce processus. APC est une protéine qui possède 3 sites de liaison pour la  $\beta$ -caténine ainsi que de nombreux sites de liaison pour l'axine. Or, dans la plupart des cancers colorectaux de même que dans plusieurs lignées cancéreuses intestinales, il y a une perte des domaines de liaison pour la  $\beta$ -caténine sur APC. Ceci réduit significativement la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine amenée par GSK3 $\beta$  et permet l'accumulation de la  $\beta$ -caténine nucléaire (Polakis et al., 1999 ; Bright-Thomas et Hargest, 2003 ; Oving et Clevers, 2002).

Suivant la liaison d'un facteur Wnt à son récepteur, la voie  $\beta$ -caténine/TCF peut être activée. Les facteurs Wnt constituent une famille de glycoprotéines riches en cystéine pouvant se lier à la partie extracellulaire de récepteurs nommés Frizzled (Dale, 1998). Structurellement, les récepteurs Frizzled possèdent 7 domaines transmembranaires et plus de 16 ligands sont connus jusqu'à maintenant chez les mammifères. Une des principales réponses cellulaires amenées par la liaison des facteurs Wnt à leurs récepteurs est l'inactivation de la GSK3 $\beta$ . En effet, cette liaison active la phosphoprotéine dishevelled (Dvl) provoquant l'inactivation de la GSK3 $\beta$ . Conséquemment, la  $\beta$ -caténine n'est plus phosphorylée et peut s'accumuler dans le cytosol et éventuellement dans le noyau.

La  $\beta$ -caténine stabilisée peut ensuite transloquer au niveau du noyau et agir en tant que co-activateur de transcription en se liant aux facteurs de transcription de la famille TCF/LEF1 (T cell factor/ Lymphocytes enhancer factor). Ces facteurs de

transcription ont d'abord été identifiés comme des protéines reconnaissant une séquence nucléotidique spécifique sur l'ADN des lymphocytes (Travis et al., 1991). Maintenant, on connaît 4 membres à cette famille de facteurs de transcription : LEF-1, TCF-1 TCF-3 et TCF-4. Dans tous les types cellulaires, les domaines de liaison à l'ADN de ces protéines, les domaines HMG, sont hautement conservés. Ces facteurs de transcription, possédant seulement le domaine de liaison à l'ADN, sont incapables à eux-seuls de stimuler la transcription. Leur activation dépend entièrement de leur association avec d'autres protéines possédant une fonction de transactivation comme la  $\beta$ -caténine (Carlsson et al., 1993). La surexpression de la forme dominante négative de LEF-1/TCF (liant toujours l'ADN, mais incapable de lier la  $\beta$ -caténine), résulte en l'inhibition de la transcription des gènes cibles de la voie (Molenaar et al., 1996). Cependant, une fois le complexe transcriptionnel  $\beta$ -caténine/TCF assemblé, il peut contrôler l'expression de plusieurs gènes cibles comme c-myc (He et al., 1998) la cycline D1 (Tetsu et McCormick, 1999), COX-2 (Howe et al., 1999), MMP-7 (Brabletz et al., 1999) (schéma 6). La voie  $\beta$ -caténine/TCF est une voie de signalisation essentielle au développement de tous les types cellulaires. Chez les vertébrés, elle est impliquée dans la morphogenèse des follicules pileux et contrôle également le compartiment des cellules souches épidermiques (Huelsken et al., 2001). Au niveau de l'intestin, l'importance de cette signalisation n'est plus à démontrer. En effet, la cascade  $\beta$ -caténine/TCF, joue un rôle central dans la régulation de la prolifération des cellules intestinales. Des altérations dans sa régulation sont d'ailleurs détectées dans plus de 90% des cancers colorectaux (Morin, 1999). Dans ces tumeurs, on note une forte présence de la  $\beta$ -caténine nucléaire (Brabletz et al., 1998). Plus intéressant encore, plusieurs évidences suggèrent l'importance de cette



### Schéma 6. Voie de signalisation $\beta$ -caténine/TCF.

Lorsque les facteurs Wnt se fixent aux récepteurs Frizzled, il y a activation de la protéine Dvl empêchant l'action du complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine formé par l'axine, GSK3 $\beta$  et APC. Ainsi stabilisée, la  $\beta$ -caténine transloque au noyau et s'associe aux facteurs de transcription LEF/TCF permettant l'expression des gènes cibles de la voie. La  $\beta$ -caténine associée à la E cadhérine peut également participer à la voie.

Tiré et modifié du catalogue de Cell Signaling 2002

voie dans le maintien du compartiment prolifératif de la crypte intestinale (van de Wetering, 1998). Des études menées dans des souris TCF4  $-/-$ , le TCF le plus exprimé dans l'intestin, ont également mis en lumière l'importance de la voie. Ces souris présentent un intestin avec un nombre réduit de cellules épithéliales et de villosités. Leur caractéristique majeure réside en leur incapacité à maintenir un compartiment prolifératif de cellules souches intestinales (Korinek et al., 1998). Il semble donc évident que la voie  $\beta$ -caténine/TCF, plus particulièrement via TCF-4, est requise pour le renouvellement intestinal.

La voie  $\beta$ -caténine/TCF est une voie de signalisation hautement régulée et la cellule est pourvue de plusieurs mécanismes permettant son inhibition autre que par la dégradation de la  $\beta$ -caténine via GSK3 $\beta$ . La transcription amenée par le complexe transcriptionnel peut être complètement abolie par l'expression de la protéine Grg (Groucho), un co-répresseur exprimé dans tous les types cellulaires (Roose et al., 1998). Cette protéine est impliquée dans le recrutement d'histones désacétylases, laissant l'ADN sous sa conformation condensée, donc inaccessible. De plus, chez la drosophile il a été démontré que les CBP peuvent acétyler la  $\beta$ -caténine en N-terminal. Cette acétylation, dans la région d'interaction avec TCF, diminue l'affinité entre les 2 protéines et il s'ensuit une diminution de la transactivation (Waltzer et Bienz 1998). Dernièrement, le groupe de Seeling et al. (1998) a établi que la sous unité B56 de la PP2A pouvait déphosphoryler certaines composantes du complexe APC/Axine/GSK3 $\beta$  et mener à l'inhibition de la voie. Finalement, il est bien connu que la surexpression de la E-

cadhérine séquestre la  $\beta$ -caténine à la membrane, l'empêchant d'aller agir au noyau en tant que co-activateur de transcription (Orsulic, 1999).

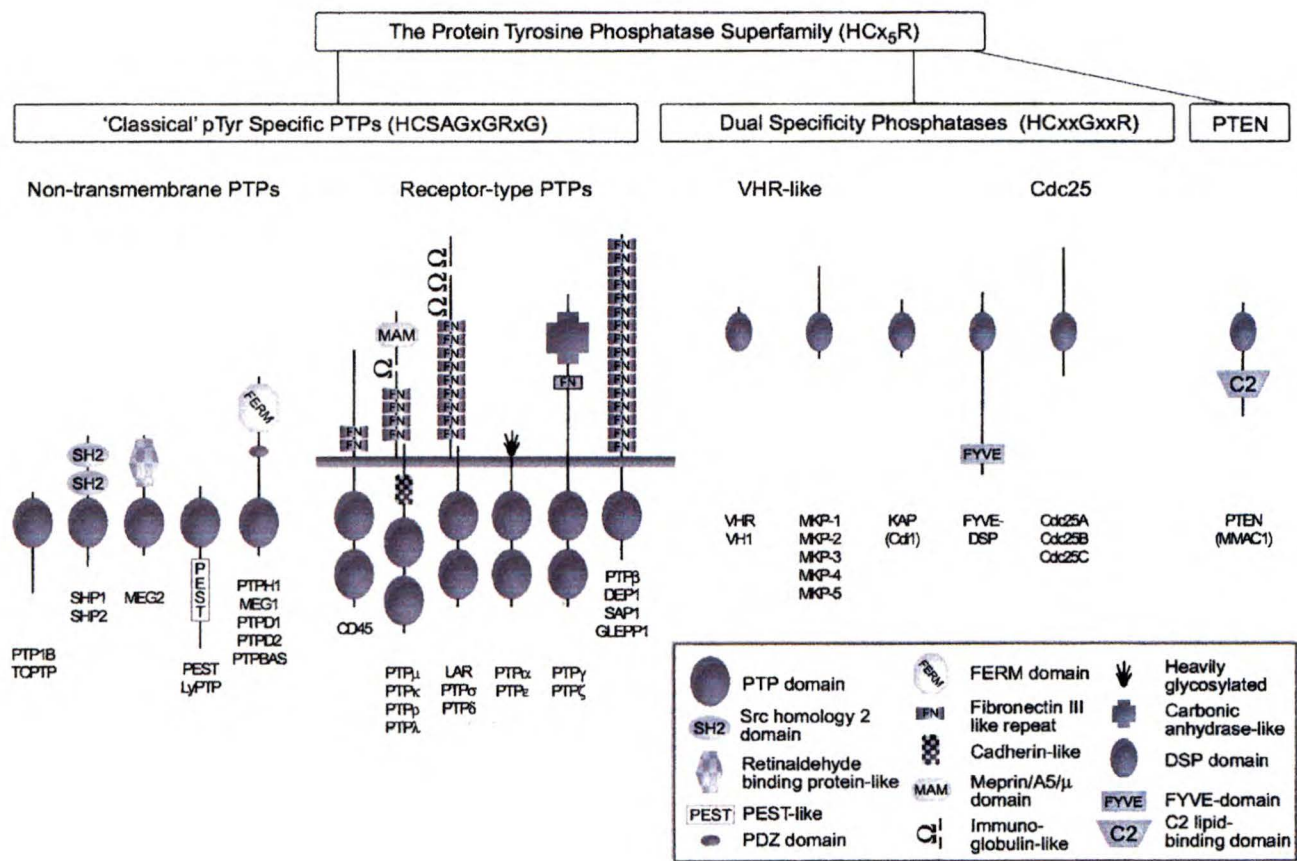
### **3. LES TYROSINE PHOSPHATASES**

La phosphorylation ainsi que la déphosphorylation sur résidu tyrosine constituent des événements importants dans une multitude de processus cellulaires incluant la prolifération, la migration, la différenciation et l'apoptose (Hunter, 1995). La majeure partie de la phosphorylation dans une cellule eucaryote survient sur résidus Ser/Thr alors que phosphorylation sur tyrosine, pour sa part, ne compte que pour 0.05% de la phosphorylation totale. Cependant, suite à une transformation oncogénique (Levinson et al., 1980) ou à une stimulation par des facteurs de croissance (Ushiro et Cohen, 1980), le niveau de phosphorylation global sur tyrosine dans la cellule augmente dramatiquement. Alors même si la phosphorylation sur tyrosine est moins répandue, il n'en demeure pas moins qu'elle médie des fonctions cellulaires très spécifiques.

Le niveau de phosphorylation sur tyrosine dans une cellule dépend à la fois des tyrosine kinases (PTKs) et des tyrosine phosphatases (PTPs). On a longtemps pensé que les tyrosine phosphatases ne servaient qu'à renverser la phosphorylation amenée par les tyrosine kinases. Maintenant, on sait que les deux types d'enzymes peuvent coopérer ou s'antagoniser afin de mener à une réponse cellulaire précise et appropriée (Sun et Tonks, 1994).



En 1988, Tonks et al. ont identifié la première tyrosine phosphatase : PTP1B. Depuis, le clonage moléculaire a permis l'identification plus de 100 types de tyrosine phosphatases (Zhang, 1998). Malgré des poids moléculaires et des structures très différents, les PTPs se définissent toutes par la présence d'un domaine ayant une origine commune hautement conservée. En effet, ce domaine d'environ 240 résidus d'acides aminés, caractérise le domaine phosphatase de toutes les tyrosine phosphatases autant chez les eucaryotes que chez les procaryotes (Zhang , 1998). Il comporte un motif signature constitué par les acides aminés (H/V)C(X)<sub>5</sub>R(S/T) dont le résidu cystéine s'avère essentiel à la catalyse : son absence entraîne l'inactivation de l'enzyme. Le résidu cystéine des PTPs a permis l'identification de plusieurs de leurs substrats. En effet, étant dans l'impossibilité de déphosphoryer son substrat en l'absence de ce résidu critique, la PTP y demeure fixée (Guan et Dixon, 1991). Mis à part leur domaine catalytique, les PTPs possèdent différents domaines non catalytiques et régulateurs impliqués dans des interactions protéine-protéine ou dans le contrôle de la localisation cellulaire (Charbonneau, 1992). Toutes les PTPs sont également inhibées par le vanadate, un inhibiteur non compétitif (Hunter, 1995). La superfamille des PTPs se divise en 3 classes : les PTPs à double spécificité, les PTPs lipidiques ainsi que les PTPs classiques. (Tonks et Neel, 2001) (schéma 7).



### Schéma 7. Superfamille des tyrosine phosphatases.

Les différents membres de la superfamille des tyrosine phosphatases sont représentés dans le graphique suivant et accompagnés d'exemples pour chacune des classes. Les multiples domaines composant les tyrosine phosphatases classiques, les tyrosine phosphatases à double spécificité ainsi que les phosphatases lipidiques sont illustrés.

Tiré de Tonks et Neel, 2001

### 3.1. Les phosphatases à double spécificité

VH1 (issue de *vaccinia virus*) a été la première phosphatase à double spécificité identifiée pour son habileté à déphosphoryler autant sur résidus sérine/thréonine que tyrosine (Byon et al., 1997). Aujourd'hui, les rôles physiologiques des phosphatases à double spécificité sont d'une importance capitale dans la transduction des signaux intracellulaires. Parmi les membres de cette famille, on compte les MAP kinases phosphatases (MKPs). Plusieurs évidences relient l'inactivation des MAPKs à l'action des MKPs. En effet, la surexpression de MKP-1 cause une forte diminution des gènes connus pour être induits par les MAPKs ainsi qu'une inhibition de la prolifération suite à une stimulation de cellules à l'insuline (Kusari et al., 1997). Un autre membre de la famille, Cdc25, est connu pour déphosphoryler la Thr14 et la Tyr15 des CDKs (cyclin dependent kinase). Ceci mène à l'activation des complexes cycline/CDK, permettant ainsi la progression entre les différentes étapes du cycle cellulaire (Draetta et Eckstein, 1997).

### 3.2. Les phosphatases lipidiques

Le substrat physiologique de certaines phosphatases ne sont pas des protéines, mais plutôt des phospholipides. La mieux caractérisée demeure sans conteste PTEN, le produit d'un gène suppresseur de tumeur. Cette phosphatase est responsable de l'enlèvement d'un groupement phosphate en position 3 du groupement inositol. Ceci

mène à l'inhibition de la voie PI-3K dû à un empêchement de AKT et d'autres protéines à domaines PH de transloquer à la membrane plasmique pour y être activées. Il est d'ailleurs clairement établi que la surexpression d'une forme active de PTEN dans les cellules entraîne une diminution de l'activation d'AKT (Davies et al, 1998). PTEN peut également déphosphoryler des protéines sur résidus sérine/thréonine. Elle serait impliquée dans la régulation de plusieurs voies de signalisation intracellulaire comme la voie des MAPKs via la déphosphorylation de Shc (Ong et al., 2001). Cependant, le rôle de PTEN comme protéine phosphatase demeure encore obscur.

### 3.3. Les tyrosine phosphatases classiques

#### 3.3.1. Les tyrosine phosphatases de type récepteur

Ce type de phosphatase, exprimée à la surface des cellules, se compose de régions physiques bien caractéristiques. Chacune des phosphatases de cette classe comprend un domaine extracellulaire offrant des sites de liaison pour des ligands potentiels. Les motifs structuraux composant ce domaine rappellent ceux des immunoglobulines et des fibronectines compris dans les molécules d'adhésion. Ils présentent également de nombreux sites de glycosylation et des régions riches en cystéines. La portion transmembranaire, quant à elle, assure le lien entre la partie extracellulaire et intracellulaire de la phosphatase. Finalement, l'activité phosphatasique est contenue dans l'extrémité intracellulaire de la protéine. La plupart

des phosphatases de type récepteur sont pourvues de 2 domaines phosphatases. La plus grande partie de l'activité est retrouvée dans le domaine phosphatase situé en N-terminal de la protéine. L'autre domaine catalytique aurait plutôt une fonction dans le recrutement de protéines régulatrices (Tonks et Neel, 2001 ; Byon et al., 1997).

Certaines de ces phosphatases sont impliquées dans les interactions cellules-cellules. C'est le cas entre autres de PTP $\kappa$  et de PTP $\mu$ . Le domaine intracellulaire de PTP $\mu$  peut lier et déphosphoryler le domaine intracellulaire de la E-cadherine. Cette déphosphorylation entraîne une stabilisation des jonctions cellulaires (Brady-Kalnay et al., 1995). Les phosphatases PTP $\beta$  et PTP $\zeta$  elles, ont plutôt des implications dans l'adhésion des neurones entre-elles (Peles et al., 1995).

CD45, une phosphatase spécifique aux cellules d'origine hématopoïétique, est un autre exemple de phosphatase transmembranaire. L'activité de CD45 est nécessaire à l'engagement des cellules T suite à la liaison d'un antigène du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Byon et al., 1997). De plus, CD45 est absolument nécessaire à la signalisation amenée par la liaison de IgM et des IgD dans les cellules du thymus (Byth et al., 1996).

### 3.3.2. Les tyrosine phosphatases cytoplasmiques

Contrairement aux phosphatases transmembranaires, les phosphatases cytoplasmiques ne possèdent qu'un seul domaine phosphatase. Cependant, elles

contiennent toutes le motif signature caractéristique des tyrosine phosphatases. Ce site catalytique est compris entre des séquences impliquées dans la régulation, la localisation et dans la reconnaissance du substrat. Une multitude de protéines appartiennent à cette catégorie dont le premier membre à avoir été identifié est PTP1B (Tonks et al, 1988).

#### 3.3.2.1. Tyrosine phosphatase à domaines SH2

SHP-1 et SHP-2 appartiennent à une classe bien particulière puisqu'elles sont les seules tyrosine phosphatases connues pour posséder, dans leur séquence, deux domaines SH2 (src homology). Les domaines SH2, également retrouvés dans une multitude de protéines de signalisation, lient les résidus phosphorylés sur tyrosine sur d'autres protéines. Cette caractéristique permet le recrutement de ces phosphatases aux substrats appropriés. Plus intéressant encore, les domaines SH2 de ces protéines sont impliqués dans la régulation de leur activité catalytique, plus particulièrement le domaine N-SH2. En absence de ligand phosphorylé sur tyrosine, les domaines SH2 recouvrent le domaine phosphatase, résultant en l'inactivation de l'enzyme. Seule la reconnaissance d'un résidu phosphorylé parvient à lever cette inhibition (Tonks et Neel, 2001). Bien qu'elles partagent plus de 60% d'homologie, les fonctions biologiques ainsi que la localisation cellulaire de SHP-1 et SHP-2 diffèrent énormément. Alors que SHP-1, majoritairement exprimée dans les cellules hématopoïétiques, semble plutôt exercer un rôle négatif sur la signalisation, SHP-2, dont l'expression est ubiquitaire, l'influence positivement (Streuli, 1996).

### 3.3.2.1.1. La tyrosine phosphatase SHP-2

Connue aussi sous le nom de SHPTP-2, Syp, PTP2C et PTP1D, SHP-2 joue un rôle positif dans la signalisation de plusieurs récepteurs à activité tyrosine kinase : les récepteurs hormonaux et les récepteurs à cytokines. Via ses domaines SH2, SHP-2 peut être recrutée directement entre-autre par le récepteur du PDGF (Feng et al., 1993), le récepteur Il-2 (Nelson et al., 1994) et par le récepteur à l'EGF suite à leur activation (Wong et Johnson 1996). D'autres études ont, quant à elles, démontré que SHP-2 pouvait également être recrutée au récepteur de l'IGF-I (Seely et al., 1995). Le recrutement de SHP-2 aux récepteurs permet la phosphorylation sur tyrosine de sa partie carboxy-terminale, créant ainsi des sites d'association pour des protéines telles la protéine adaptatrice Grb2 (Li et al., 1994), la sous-unité catalytique de la PI-3K et Shc (Okada et al., 1996). La liaison à Grb2, plus précisément, permet l'initiation de plusieurs événements métaboliques et mitogéniques comme démontré dans les fibroblastes par Rivard et al. en (1995).

Des études menées chez *Drosophila* et *Caenorhabditis elegans* ont permis de montrer que SHP-2 est une composante essentielle à la transmission adéquate de la signalisation des récepteurs de croissance (Van Vactor et al, 1998). En parallèle, Xiao et al. (1994) ont démontré que la micro-injection d'anticorps bloquant dirigés contre SHP-2 inhibait entièrement les effets mitogéniques amenés par une stimulation à l'EGF ou l'IGF-1 (Xiao et al., 1994). D'ailleurs, les souris homozygotes pour l'allèle SHP-2

mutante meurent après 2 semaines de gestation, ce qui confirme bien son rôle important (Arrandel et al., 1996). Mises ensemble, la plupart des études réalisées sur SHP-2 tendent à démontrer qu'elle influence positivement la transmission du signal mitogénique induit par les facteurs de croissance.

#### 3.3.2.1.2. La tyrosine phosphatase SHP-1

Depuis la découverte en 1975 d'une souris possédant une mutation naturelle dans le gène codant pour SHP-1 (Green et Shultz, 1975), les études portant sur cette phosphatase se multiplient. Tout comme SHP-2, SHP-1 est une tyrosine phosphatase qui possède 2 domaines SH2 ainsi qu'un domaine phosphatase (schéma 8A). Cependant, l'expression de SHP-1 est restreinte aux cellules hématopoïétiques et à certains tissus épithéliaux. Dernièrement, une équipe de chercheurs a identifié l'expression d'un variant d'épissage de la protéine lui conférant une localisation nucléaire dans les cellules épithéliales (Craggs et Kelli, 2001). Son rôle négatif dans la régulation de plusieurs voies de signalisation induite par des cytokines, des interleukines, des facteurs de croissance et des molécules d'adhésion n'est plus à démontrer. Dans toutes ces voies de signalisation, SHP-1 est recrutée, via ses domaines SH2, à ses substrats phosphorylés sur tyrosine. Il y a alors activation de l'enzyme et inhibition des voies effectrices (schéma 8B).

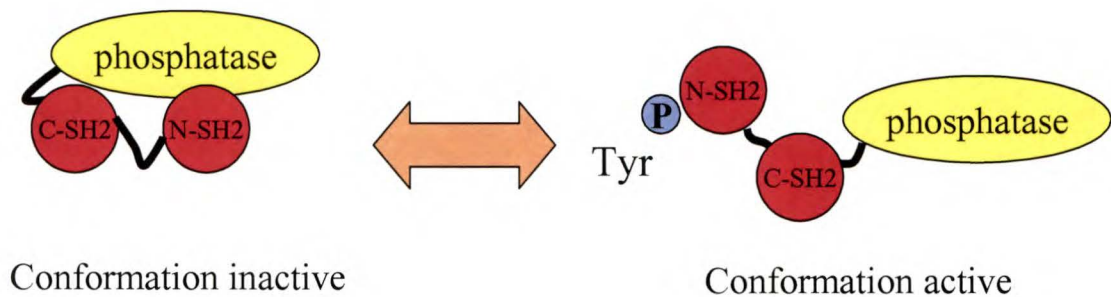
C'est grâce à ces souris mutantes appelées *motheaten* que les chercheurs sont parvenus à identifier plusieurs rôles de SHP-1 dans les cellules du système immunitaire. Il existe 2 mutations naturelles qui caractérisent ces souris : *motheaten* (*me*) et *motheaten*



## A. Structure



## B. Activation



### Schéma 8. Structure et activation de la protéine tyrosine phosphatase SHP-1.

(A) Les domaines SH2, impliqués dans le recrutement de la protéine à d'autres protéines phosphorylées sur tyrosine ainsi que dans la régulation de l'activité phosphatasique, sont situés en N-terminal de la protéine. Le domaine contenant l'activité phosphatase est plutôt situé en C-terminal de la protéine. (B) Lorsque les domaines SH2 lient une tyrosine phosphorylée, l'autoinhibition de la protéine est levée, elle est alors sous sa conformation active.

viable ( $me^v$ ). Les souris hétérozygotes pour ces allèles ne présentent aucune anormalité. Cependant, le phénotype des souris  $me/me$  et  $me^v/me^v$  est assez sévère et leur durée de vie se limite à 2-3 et 9-12 semaines respectivement (Tonks et Neel, 2001). Les souris  $me$  n'expriment pas SHP-1 car une mutation ponctuelle dans le premier domaine SH2 de la protéine cause l'apparition d'un codon de terminaison de la transcription. Les mutantes pour l'allèle  $me^v$  expriment, pour leur part, un niveau normal de la protéine. Son activité est cependant grandement compromise en raison d'une mutation ponctuelle dans le domaine catalytique de la phosphatase (Shultz et al., 1984). Peu importe la nature de leur mutation, toutes les souris *motheaten* souffrent d'une hyperprolifération et d'une activation inadéquate des granulocytes et des macrophages. Ceci cause leur accumulation incontrôlée dans les alvéoles pulmonaires et engendre une mort précoce des souris (Kozlowski et al., 1993).

#### 3.3.2.1.2.1. Régulation négative de la signalisation par SHP-1

SHP-1 (SHPTP-1, SHP, HCP, PTP1C) peut réguler négativement la prolifération et la différenciation des cellules précurseurs d'érythrocytes via la voie JAK/STAT. Une fois que l'érythropoïétine lie son récepteur rEpo, ce dernier dimérise permettant le recrutement et l'activation par transphosphorylation des tyrosine kinases JAK2 (Janus associated kinase) (Starr et Hilton, 1999). L'activité des JAKs est nécessaire : le récepteur lui-même est dépourvu de toute activité tyrosine kinase intrinsèque. Les JAKs phosphorylent ensuite plusieurs cibles cellulaires incluant les facteurs de transcription STATs et le récepteur à l'érythropoïétine lui-même créant plusieurs sites potentiels de

recrutement pour des molécules de signalisation (Linnekan et al., 1992). La régulation négative de cette voie de signalisation est longtemps demeurée obscure, mais il est maintenant évident que SHP-1 y participe. En se liant au récepteur et aux JAKs via ses domaines SH2, SHP-1 cause leur déphosphorylation puis la terminaison du signal de prolifération. Il est également bien connu que les cellules qui expriment un récepteur à l'érythropoïétine mutant pour les sites d'association pour SHP-1 présentent une hypersensibilité à ce ligand (Klingmuller et al., 1995). Comme la famille des JAKs participe à l'activation de plusieurs autres récepteurs à cytokines, SHP-1 assure également une régulation négative des voies de signalisation engendrées par ces derniers. C'est le cas entre autres des récepteurs à IL-3 $\beta$  (Paling et Welham, 2002) et aux interférons  $\alpha/\beta$  (INF $\alpha/\beta$ ) dont l'activité est régulée négativement par SHP-1 (Yetter et al., 1995).

Plusieurs évidences suggèrent une implication de SHP-1 dans la régulation négative des cellules T et des cellules B. En effet, des cellules B, isolées à partir des souris *motheaten*, présentent une hypersensibilité à des concentrations sub-mitogéniques de la partie F(ab')<sub>2</sub> d'un anticorps anti-Ig. Des études plus poussées ont permis de démontrer que SHP-1 s'associait de façon constitutive au complexe BCR (B-cell receptor) pour en contrôler l'activité (Pani et al., 1995).

Finalement, les fonctions de SHP-1 ne se limitent pas uniquement à la régulation négative de la prolifération des cellules du système immunitaire. Dans plusieurs cellules d'origine épithéliale, SHP-1 possède la capacité de lier des récepteurs à activité tyrosine

kinase, surtout des récepteurs à facteurs de croissance, et mener à leur déphosphorylation. Suite à la liaison de leur ligand, le domaine intracellulaire de ces récepteurs s'autophosphoryle rapidement. Les sites de phosphorylation générés sont immédiatement reconnus par des molécules de signalisation à domaine SH2. Ceci mène ultimement à des réponses cellulaires aussi variées que la prolifération, la différenciation et la migration. Le récepteur du PDGF (Yu et al., 1998), de l'EGF (Tomic et al., 1995), du NGF (Vambutas et al., 1995) et le récepteur Ros (Keilhack et al., 2001) ne sont que quelques exemples de récepteurs dont l'autophosphorylation permet le recrutement et l'activation de SHP-1 menant à une terminaison de leur signal.

Une des protéines recrutées aux récepteurs aux facteurs de croissance et aux cytokines suite à leur activation est la PI-3K et ce, via son domaine SH2. Ensuite, la PI-3K peut elle-même subir une phosphorylation activatrice sur tyrosine par les récepteurs la recrutant ou par des kinases associées. Des études menées dans les cellules cancéreuses de sein et dans des cellules myéloïdes ont démontré que SHP-1 pouvait s'associer directement à la PI-3K suite à sa phosphorylation sur tyrosine. La déphosphorylation amenée par SHP-1 conduit à une diminution de l'activité catalytique de la PI-3K et conséquemment, à la modulation négative de la voie PI-3K/AKT (Yu et al., 1998 ; Cuevas et al., 1999).

Bien qu'il existe de nombreux autres substrats connus pour SHP-1 (schéma 9), leur association avec celle-ci mène presque toujours à leur déphosphorylation ainsi qu'à une modulation de leur activité de signalisation. Cependant, de plus en plus d'évidences

<u>Récepteurs de type tyrosine kinase</u> <i>Déphosphorylation directe du récepteur activé</i>	c-kit, REGF, RI, RPDGF, CSF-1, TrkA, KDR
<u>Récepteurs à cytokine</u> <i>Déphosphorylation des kinases JAK associées</i>	IL-3, IFN- $\alpha/\beta$ , érythropoïétine
<u>Autres</u>	RAFTK/PYK2 <i>in vitro</i> , SIRP $\alpha$ /SHPS-1, Bgp1, p85 (PI3K), p120 <sup>ctn</sup> IRS-1, Shc, Erg, HOXA10
<u>Récepteurs du système immunitaire</u>	
<u>Cellules B</u>	B cell Ag receptor (sous- unités Ig $\alpha$ -Ig $\beta$ ), CD22, CD72 et Fc $\gamma$ RIIB (ITIM), Vav, Syk, p85 de la PI3K (IL-4), SLP-65 (BLNK)
<u>Cellules T</u>	Composés du TCR : LcK, Zap-70, Vav, SLP-76

**Schéma 9. Substrats connus de SHP-1.**

Tiré et modifié de Tonks et Neel, 2001

tendent à accorder à SHP-1 des fonctions autres que dans la terminaison des signaux mitotiques. Une étude récente dans les cellules myéloïdes montre que SHP-1 peut contrôler l'activité transcriptionnelle de certains facteurs de transcription tels HOXA10 (Elkund, 2002). Il semblerait également que SHP-1 puisse moduler le courant ionique de ERG, un canal potassique exprimé à la surface des cellules microgliales (Cayabyab et al., 2002).

#### **4. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DU PROJET DE RECHERCHE**

Les rôles inhibiteurs de SHP-1 dans la prolifération des cellules hématopoïétiques sont bien caractérisés. Cependant très peu d'études portent sur les rôles de SHP-1 dans les cellules épithéliales, même s'il existe un variant d'épissage spécifique seulement exprimé dans ces cellules (Craggs et Kelli, 2001). Nous avons donc entrepris d'analyser le rôle de SHP-1 dans les cellules épithéliales intestinales. **En se basant sur des études débutées dans le laboratoire, nous avons émis l'hypothèse que SHP-1 contrôlait négativement la prolifération des cellules épithéliales intestinales.** Les expériences entreprises afin de vérifier cette hypothèse ont été effectuées dans différents modèles cellulaires bien caractérisés pour l'étude de l'épithélium intestinal : les HIEC et IEC-6 (cellules épithéliales indifférenciées de la crypte intestinale humaine et de rat ) et les Caco-2/15 (adénocarcinomes humains capables de se différencier après l'atteinte de la confluence). Plusieurs résultats ont également été validés *in vivo* dans l'intestin fœtal humain et dans les souris *me<sup>y</sup>*. Cinq objectifs principaux ont été émis afin de vérifier notre hypothèse. L'objectif 1 était d'analyser l'expression, la localisation et l'activité

phosphatasique de SHP-1 dans nos modèles cellulaires de même que dans l'intestin fœtal humain. L'objectif 2 était de mettre en évidence les effets d'une surexpression de la forme sauvage et mutante inactive de SHP-1 sur l'expression de la cycline D1, c-myc, DHFR, et c-fos. L'activité transcriptionnelle du complexe  $\beta$ -caténine/TCF a également été analysée en utilisant le gène rapporteur TOP-FLASH. L'objectif 3 était d'analyser le statut de la  $\beta$ -caténine de même que l'expression de la cycline D1 et de c-myc dans l'épithélium intestinal des souris *me<sup>v</sup>*. L'objectif 4 était d'établir une population de cellules épithéliales intestinales surexprimant SHP-1 ou sous sa forme mutante dominante négative. Finalement, l'objectif 5 était d'identifier de nouveaux substrats/partenaires de SHP-1 dans les cellules épithéliales intestinales par la technique du double hybride.

## CHAPITRE II

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 1. Matériel

Pour mener à bien l'étude de la protéine tyrosine phosphatase SHP-1, trois anticorps principaux ont été employés. L'anticorps polyclonal SHP-1 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA), dirigé contre le domaine phosphatase de la protéine, a été utilisé pour les immunobuvardages de type Western. Le second anticorps, généreusement offert par la Dre Nicole Beauchemin (Université McGill, Montréal, Québec) a été employé à des fins d'immunofluorescence indirecte. Finalement, le troisième anticorps, donné par la Dre Clara Nahmias (Institut Cochin de Génétique Moléculaire, Paris) a servi dans les études d'immunoprécipitation. Les anticorps monoclonaux dirigés contre les résidus phosphorylés sur tyrosine (PY99) et HA ainsi que les anticorps polyclonaux CDK2, TBP, cycline D1 proviennent de Santa-Cruz (Santa Cruz, CA). L'anticorps monoclonal dirigé contre la  $\beta$ -caténine (250  $\mu$ g/ml) a, quant à lui, été acheté chez Transduction Laboratories (Mississauga, ON). pRb (PharMingen, Mississauga, ON, Canada), c-myc (Roche Diagnostics, Laval, Québec) et sucrase-isomaltase (HSI-14 don de A.Quaroni, Cornell University) figurent également parmi les anticorps utilisés. Le dosage de l'activité enzymatique de SHP-1 a été effectué au moyen d'un ensemble commercial spécialement conçu pour doser l'activité SHP-1 (PTP assay



kit, Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA). Tous les autres produits proviennent de Sigma-Aldrich USA à moins de mention contraire.

## **2. Spécimens animaux et humains**

Les souris homozygotes mâles mutantes pour SHP-1 C57aBL/6J-Hcph *mev* ainsi que les souris contrôles C57BL/6J ont été achetées chez Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA). Pourvues, d'une durée de vie relativement restreinte, 9-12 semaines, ces souris présentent une mutation ponctuelle dans le gène encodant pour SHP-1. Cette mutation entraîne une protéine qui s'exprime normalement, mais dont l'activité phosphatase est diminuée de 80%.

Les tissus humains, issus de fœtus âgés entre 17-20 semaines, proviennent d'interruption de grossesses. L'âge des fœtus est évalué au moyen d'échographie ou du dossier médical. Aucun tissu provenant de fœtus ayant des pathologies apparentes ou mort né n'a été utilisé. Ces prélèvements sont approuvés par le comité d'éthique de l'Université de Sherbrooke.

### 3. Culture cellulaire

#### 3.1. Les cellules HIEC.

La lignée cellulaire HIEC «humain intestinal epithelial cell », est composée de cellules épithéliales issues de la crypte intestinale humaine. Cette lignée cellulaire a été établie dans le laboratoire du Dr Jean-François Beaulieu au département d'Anatomie et Biologie Cellulaire (Université de Sherbrooke) (Perreault et Beaulieu, 1996). Ces cellules possèdent la particularité de proliférer jusqu'à l'atteinte de la confluence. Dès lors, elles cessent toute prolifération en phase G1 du cycle cellulaire et demeurent incapables d'entamer un processus de différenciation même en présence de dexaméthasone ou lorsque cultivées sur différentes matrices. Ces cellules sont maintenues en culture dans un milieu DMEM (Dulbecco's modifié Eagle's medium, Gibco/BRL, Burlington, ON) supplémenté de 5% sérum de bovin fœtal (FBS), 2mM glutamine, de pénicilline 100 unités/ml, streptomycine 100µg/ml (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) et d'insuline 100 unité/ml (Novilin<sup>®</sup> ge Toronto) dans une atmosphère humide (5% CO<sub>2</sub>, 95% air).

#### 3.2. Les cellules Caco-2/15.

Isolée à partir d'un adénocarcinome de côlon humain, la lignée cellulaire Caco-2 présente les caractéristiques des entérocytes du petit intestin. Le clone 15, fourni par le Dr Quaroni (Cornell University, Ithaca, NY) et issu de la lignée parentale Caco-2, a été bien caractérisé pour présenter un fort niveau d'expression et une forte activité sucrase-

isomaltase (Beaulieu et Quaroni, 1991). Contrairement aux HIEC, les Caco-2/15 sont capables d'entamer un processus de différenciation entérocytaire suite à un arrêt de leur prolifération à l'atteinte de la confluence (Deschênes et al., 2001). Ces cellules sont cultivées dans les mêmes conditions que les cellules HIEC, mis à part un pourcentage de FBS de 10% et l'absence d'insuline.

### 3.3. Les cellules IEC-6.

La lignée cellulaire IEC-6, composée de cellules épithéliales de la crypte intestinale de rat, a été obtenue de A.Quaroni (Cornell University, Ithaca, NY) (May et al., 1981). Tout comme les HIEC, ces cellules cessent toute prolifération à l'atteinte de la confluence sans toutefois être capables d'entamer un processus de différenciation. Ces cellules sont maintenues en culture dans une atmosphère humide (5% CO<sub>2</sub>, 95% air) avec un milieu DMEM supplémenté de 5% sérum de bovin fœtal (FBS), 2mM de glutamine et de pénicilline 100 unités/ml, streptomycine 100µg/ml.

### 3.4. Les cellules HEK293.

Les cellules de rein embryonnaire humain HEK293 ont été utilisées dans les études de transfections transitoires ainsi que pour la production de virus (Whittaker et al., 1984). Leurs conditions de culture sont identiques aux cellules Caco-2/15.

## 4. Immunofluorescence

### 4.1. Immunofluorescence indirecte sur cellules.

Les cellules HIEC, IEC-6 et Caco-2/15 ont étéensemencées sur des lamelles de verre stériles 18x18 mm dans des plaques de 6 puits. Les cellules ont été rapidement rincées 2 fois avec du PBS 1X froid puis fixées avec 2 ml d'une solution de méthanol/acétone (30/70) durant 20 min à -20°C. Au terme de l'incubation, la solution fixatrice a été retirée et les cellules ont été séchées à l'air libre 10 min. Afin de permettre leur réhydratation, elles ont été rincées avec du PBS 1X, 2 fois, dont 15 min pour la seconde fois, puis perméabilisées avec une solution de PBS 1X/Triton X-100 (0.1%) pour 10 min. Une solution de blocage, contenant PBS/BSA 2 %, a été ajoutée à chacune des lamelles pour une durée de 30 min à 25°C. Les anticorps SHP-1 et  $\beta$ -caténine, dilués dans la solution de blocage, 1/500 et 1/100 respectivement, ont été incubés en présence des cellules 2 heures à 25°C sous une chambre humide. Après 5 lavages de 1 min, les anticorps secondaires polyclonal (1/50) et monoclonal (1/50) couplés FITC (anti-rabbit Ig-fluorescein F(ab')<sub>2</sub> fragment) ont été ajoutés 30 min à l'abri de la lumière. Finalement, après 5 lavages de 1 min, une goutte de paraphénylènediamine a été déposée sur chaque lamelle en vue du montage final. La fluorescence émise suite à l'excitation sélective de FITC par une lumière de longueur d'onde de 450-495 nm a été recueillie par un microscope de type Reichert Polyvar2 (Leica Instruments, Autriche). L'acquisition d'images par système informatisé a été réalisée à l'aide du logiciel Metamorph.

#### 4.2. Souris *motheaten*<sup>v</sup> suite à l'incorporation de BrDu.

Les souris *motheaten*<sup>v</sup> et contrôles âgées de 4 semaines ont été injectées de façon intrapéritonéale avec une solution BrDu (10 mM) à raison de 1 ml/100 g de souris durant 2 hrs. Les souris ont ensuite été sacrifiées, les sections de jéjunum et de côlon extraites, lavées et congelées dans un milieu OCT (Optimum Cutting Temperature). Des cryosections de 5 µm ont été réalisées puis placées sur des lames de verre séchées avant d'être conservées à -80°C. Une fois décongelées durant 30 min à température de la pièce, les coupes ont été réhydratées pendant 2 min dans PBS 1X. Elles ont ensuite été fixées dans une solution éthanol 70/glycine 30 (50 mM, pH 2) 45 min à 25°C. Après 2 lavages de 5 min, les coupes ont été dénaturées avec du HCl 4 M 15 min à 25°C. Une solution bloquante (0.5 % BSA/ 0.1 % Tween-20/PBS 1X) a été ajoutée 10 min après 3 lavages de 5 min au PBS 1X. L'anticorps anti-BrDu (1/15) directement couplé FITC a été ajouté pour 45 min à l'abri de la lumière suivi ensuite de 3 lavages de 5 min au PBS 1X. Une goutte de Vectashield a ensuite été ajoutée à chacune des lames en vue du montage final et de l'observation au microscope (voir section 4.1).

#### 4.3. Immunofluorescence indirecte sur tissus humains.

Des coupes de 5µm de côlon et de jéjunum d'intestin fœtal humain congelés dans une solution OCT ont été réalisées avec un cryostat de type Jung Frigocut 2800N (Leica Instruments Inc, Canada). Les tissus ont été fixés 45 min dans la formaldéhyde 4 %/ PBS. Après 3 lavages de 5 min, une solution de quenching 2% PBS/glycine a été ajoutée 45

min aux coupes de tissus. Ces dernières ont ensuite été mises en présence d'une solution lait 10%/ PBS durant 30 min pour bloquer les sites non spécifiques. L'anticorps SHP-1, dilué 1/250 dans lait 5%/ PBS, a été incubé avec les tissus durant 2 hrs. Après 3 rinçages de 5 min au PBS, l'anticorps secondaire polyclonal (1/50) couplé FITC (anti-rabbit Ig-fluorescein F(ab')<sub>2</sub> fragment) a été ajouté 30 min à l'abri de la lumière. Finalement, après 3 autres lavages de 1 min, les noyaux des cellules ont été marqués avec le DAPI (Sigma Aldrich, USA) dilué 1/50 000 dans du PBS 1X puis incubé 2 minutes avec les tissus. Une goutte de paraphénylènediamine a été déposée sur chaque coupe de tissu en vue du montage final et de l'observation au microscope suite à 3 autres lavages au PBS 1X (voir section 4.1).

## **5. Immunobuvardage de type Western**

### **5.1. Immunobuvardage sur lignées cellulaires.**

Afin d'analyser l'expression des protéines issues des différentes lignées cellulaires, elles ont été lysées dans un tampon Laemmli 1X (62.5 mM Tris-HCl pH6.8, 2.3 % SDS (sodium dodecyl sulfate), 10 % glycérol, 1mM PMSF, 0.005 % bleu de bromophénol et 5% 2-β-mercaptoéthanol). Les lysats recueillis ont ensuite été chauffés 5 min à 95°C, soniqués puis réchauffés 5 min à 95°C. La concentration des différents échantillons a été déterminée par la méthode de Lowry en se basant sur une courbe standard établie avec de l'albumine de sérum bovin. Tous les échantillons ainsi que la courbe standard ont été dosés en duplicata.

40 µg de chacun des échantillons ont ensuite été déposés sur gel et séparés par SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis). Les protéines contenues dans le gel ont été transférées par électrotransfert sur une membrane de nitrocellulose. Après visualisation des protéines sur la membrane au rouge de ponceau, cette dernière a été incubée 1 hre à température pièce dans une solution de PBS/Tween 0.05% contenant 5% de lait écrémé, puis incubée 3 hrs avec l'anticorps primaire dilué 1/1000 dans la solution de blocage. Trois lavages de 10 min au PBS/Tween 0.05% ont ensuite été réalisés puis la membrane a été par la suite incubée 1 hre avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Après trois autres lavages de 10 min au PBS/ Tween 0.05%, les protéines ciblées ont été détectées par chemiluminescence (Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup>, Amersham Pharmacia Biotech, USA). Des analyses densitométriques réalisées avec le programme Scion Image.exe ont permis de quantifier les niveaux d'expression protéique.

## 5.2. Immunobuvardage sur souris *me<sup>y</sup>* et contrôles.

Après le sacrifice des souris âgées de 4 semaines par dislocation cervicale, la muqueuse de chacune des parties de l'intestin soit le jéjunum et le côlon a été extraite en vue de vérifier l'expression de protéines. Les muqueuses recueillies ont d'abord été solubilisées dans un tampon Triton 1% (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8, 40 mM β-glycérophosphate, 50 mM NaF, 200 µM orthovanadate, 10 % glycérol, 2 µg/ml aprotinine, 2 µg/ml leupeptine, 2 µM pepstatine, 0.2 mM PMSF) à l'aide d'un homogénéisateur à eppendorf. Les lysats ont été centrifugés

à 10 000 rpm durant 10 min, et les surnageants ont été récoltés. La moitié de chacun des lysats a été dosée selon la méthode BCA Pierce et conservée pour des études de co-immunoprécipitation. L'autre moitié a été solubilisée avec du tampon Laemmli 2X et soniquée 5 sec à des fins d'immunobuvardage. 40 µg de chacune des portions de l'intestin ont ensuite été déposés sur gel suivi d'un immunobuvardage de type Western comme mentionné à la section 5.1.

## **6. Immunoprécipitation**

Les cellules Caco-2/15, HIEC ou IEC-6 ainsi que les muqueuses intestinales de souris ont été lysées dans un tampon Triton (voir sections 5.1 et 5.2). Une fois les lysats débarrassés de leur débris par une centrifugation de 10 min (4°C 10 000 rpm) et dosés, 800 µg de chacun des lysats ont été prélevés. Dans un volume final de 800 µl complété avec le tampon de lyse, ces derniers ont été incubés 2-3 hrs à 4°C en présence de 0.1 à 0.5 µg d'anticorps respectivement. Par la suite, 40 µl d'une solution de protéine-A-sépharose a été ajoutée durant 1 hre au mélange contenant le lysat et l'anticorps. Il est à noter que les billes de protéines-A-sépharose, sont préalablement réhydratées 1 hre dans le tampon de lyse à raison de 0.1 mg/ml avant d'être ajoutées au mélange. Une fois l'incubation terminée, les billes ont été culottées et lavées 3 fois avec le tampon de lyse. Afin de vérifier l'interaction entre les protéines, un immunobuvardage de type Western a été réalisé (section 5.1). Dans ce cas, un tampon Laemmli 1X a été ajouté aux billes après le dernier lavage puis le tout est déposé sur gel. Cependant, l'immunocomplexe recueilli peut également servir à des fins de dosage d'activité enzymatique (voir section 7.0).



## 7. Dosage de l'activité phosphatase de SHP-1

Les cellules Caco-2/15, HIEC ont été lysées dans un tampon Triton puis 800 µg de protéines ont été immunoprécipités avec l'anticorps SHP-1 (voir section 6). Après le dernier lavage, 1/3 de l'immunoprécipité a été conservé afin de vérifier par immunobuvardage Western la quantité de protéine SHP- 1 immunoprécipitée. L'autre 2/3 a été utilisé afin de doser l'activité enzymatique de SHP-1 à l'aide d'un kit commercial (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) utilisant un phosphopeptide reconnu spécifiquement par SHP-1. Brièvement, 3 lavages de l'immunoprécipité avec un tampon phosphatase (25 mM Hepes pH7.2, 50 mM NaCl, 5 mM DTT, 2.5 mM EDTA) ont été effectués immédiatement après l'immuprécipitation. Par la suite, 750 µM d'un phosphopeptide spécifiquement reconnu par SHP-1 (RRLIEDAEpYAARG) a été ajouté aux immunocomplexes contenant SHP-1 durant 45 min à 30°C pour permettre la réaction. La détection des phosphates libérés par la réaction a été visualisée par l'ajout de 100 µl d'une solution de vert de malachite durant 15 min. Les billes ont ensuite été centrifugées et les surnageants ont été déposés dans une plaque de 96 puits pour permettre la lecture de la densité optique à 655 nm avec un spectrophotomètre BioRad Model 3550. La quantité de phosphates libérés en pmoles par la réaction phosphatase a été déterminée avec l'établissement d'une courbe standard utilisant des concentrations connues de phosphates libres.

## 8. Études de liaison à l'ADN EMSA

Des extraits nucléaires ont été préparés à partir de cellules Caco-2/15 à différents stades de confluence et de cellules HEK293 surexprimant SHP-1 WT ou SHP-1 C/S (voir section 9.2). Brièvement, les cellules ont été rincées 2 fois au PBS et recueillies avec un policeman dans 1 ml de PBS 1X. Après une centrifugation de 5 min à 1500 rpm, le culot a été resuspendu dans 100 µl du tampon de lyse (0.5 % NP-40, 10 mM Hepes pH 7.9, 1 mM EDTA, 60 mM KCl, 50 mM PMSF, 1 mM DTT). Après une centrifugation de 20 sec à 13 000 rpm, le culot résultant a été resuspendu dans 50 µl de tampon de resuspension nucléaire (0.25 M Tris pH7.8, 75 mM KCl, 50 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 µg/ml aprotinine, 1 µg/ml leupeptine, 1 µM pepstatine). Les tubes ont ensuite été plongés dans l'azote liquide 2 min, mis à 37° 2 min, vortexés 5 sec, le tout 3 fois. Finalement, les surnageants résultant d'une centrifugation de 10 min à 13 000 rpm ont été rapidement congelés dans l'azote liquide en vue de l'utilisation. Suite à leur dosage, ils ont été incubés avec une sonde radioactive contenant le site de liaison spécifique pour TCF-4, 5'GCA CCC TTT GAT CTT ACC 3'(Invitrogen, Burlington, ON). Ensuite, une électrophorèse en condition non dénaturante sur gel de polyacrylamide 4 % contenant 0.5 % de Tris Borate et 2 % glycérol s'en est suivie. Le gel résultant a ensuite été séché, puis la formation des complexes a été visualisée par autoradiographie.

## 9. Transfection transitoire

### 9.1. Vecteurs d'expression et gènes rapporteurs luciférase.

Le vecteur d'expression E2F-luciférase est composé d'une partie du promoteur de la dihydrolate réductase (DHFR) liant fortement les facteurs de transcription E2F suivie du gène luciférase. Durant le passage de la phase G1 vers la phase S, ce gène est généralement induit. Ce gène rapporteur provient du Dr P. Farnham (University of Wisconsin, USA). Le vecteur rapporteur cycline D1-luciférase comprenant les nucléotides -944 à +139 du promoteur a été offert par R. Muller (Institute of Mol. Biol and Tumor Research, Philipps-University Marburg, Germany). Afin d'étudier les capacités de transactivation de la voie  $\beta$ -caténine/TCF, le vecteur rapporteur TOPFLASH (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) a été utilisé. Ce dernier contient, dans son promoteur, 4 éléments de réponse à la famille de facteurs de transcription TCF/LEF en amont du gène luciférase. C-fos-luciférase, offert par le Dr C. Czernilofsky (Bender & Co., Vienna, Australie) ainsi que c-myc-luciférase (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) ont également été utilisés.

Le ADNc de souris complet pour SHP-1 a été offert par M. Thomas (Howard Hughes Medical Institute, St-Louis, MO). SHP-1 sauvage (SHP-1WT) a été sous-cloné dans le vecteur pcDNAneo1. La mutation critique de la cystéine 453 en sérine (SHP-1C/S) dans le domaine phosphatase a été créée par mutagenèse dirigée selon le protocole

de Clontech (Palo Alto, USA) (Rivard et al., 1995). Le mutant constitutif de souris c-src p60 Y529F est un don de la Dre Josée Lavoie (Université Laval, Qc, Canada).

## 9.2. Méthode de lipofection et essai luciférase.

Les cellules HIEC ont étéensemencées dans une plaque de 12 puits. Le lendemain de l'ensemencement, ces dernières ont été transfectées avec la méthode de lipofection à la lipofectAMINE 2000 (Invitrogen, Burlington, ON). Pour ce faire, 1 µl de lipofectAMINE 2000 par puits a été pré-incubé dans 50 µl/puits de milieu Opti-MEM (Invitrogen, Burlington, ON) 5 min. Durant ce temps, une solution contenant 0.2 µg ADN du gène rapporteur luciférase/puits supplémenté à 50 µl/puits d' Opti-MEM a été préparée. Au terme de l'incubation, les deux solutions ont été combinées et laissées en repos durant 30 min. 100 µl par puits du mélange a ensuite été ajouté aux cellules préalablement rincées et contenant 500 µl/ puits d'une solution Opti-MEM. Après 4-5 hrs, le milieu de transfection a été retiré puis remplacé par du milieu DMEM (voir section 3.1). 48 hrs après la transfection, les cellules ont été rincées rapidement avec une solution de PBS 1X puis lysées 15 min avec 300 µl d'une solution pH 7.8 contenant 25 mM glycine-glycine, 15 mM MgSO<sub>4</sub>, 4 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2 mM DTT. 270 µl du lysat cellulaire a ensuite été prélevé, puis ajouté à 120 µl d'une solution essai pH 7.6 (25 mM glycine-glycine, 15 mM MgSO<sub>4</sub>, 4 mM EGTA, 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 mM ATP et 3 mM DTT). La réaction a été initiée après l'ajout de 100 µl du tampon luciférine (25 mM glycine-glycine, 15 mM MgSO<sub>4</sub>, 4 mM EGTA, et 1 mM d-luciférine) puis l'activité luciférase est

ensuite mesurée pendant 20 sec par un luminomètre Mini Lumat LB9506 (EG&G Berthold, Germany).

### 9.3. Transfection au phosphate de calcium.

Les cellules HEK293 ont étéensemencées à densité égale dans des pétris de 100mm. Le lendemain, 1 hre avant la transfection, le milieu de culture a été retiré et remplacé par 6 ml de milieu frais. Une solution de 5 µg d'ADN, à laquelle est ajouté goutte à goutte 30 µl de CaCl<sub>2</sub> 2.5 M ainsi que 300 µl de HBSP (280 mM NaCl, 1.5 mM NA<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 mM glucose, 10 mM KCl, 50 mM Hepes pH 7.05) complétée à 600 µl avec de l'eau stérile est incubée 15 min à température ambiante. Le mélange a été ajouté aux pétris goutte à goutte puis les cellules ont été remises à l'incubateur durant la nuit. Le lendemain matin, le milieu de culture a été remplacé par 10 ml de milieu frais. Les cellules ont finalement été lysées dans un tampon Triton 48 hrs après la transfection.

## 10. Double hybride

Les études de double hybride ont été effectuées au moyen du protocole commercial MATCHMAKER Two-Hybrid System (Clontech, Palo Alto, USA)

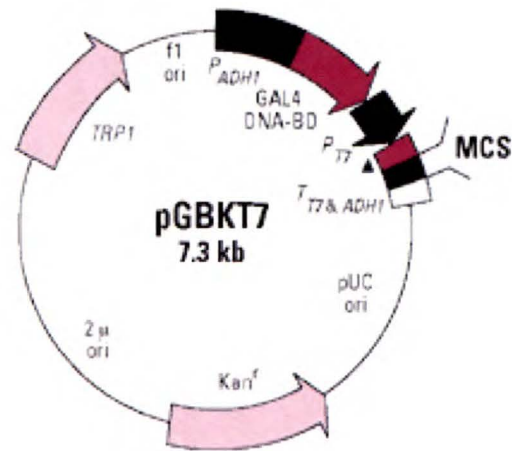
### 10.1. Vecteur de levures.

Le vecteur pGADT7 est conçu pour permettre l'expression d'une protéine d'intérêt en fusion avec le domaine d'activation de GAL4, un facteur de transcription. Dans la levure, la protéine de fusion est fortement exprimée puisqu'elle est sous le contrôle d'un promoteur constitutif. Suite à son expression, cette dernière sera dirigée vers le noyau grâce à un signal de localisation nucléaire provenant de SV40. Le vecteur contient entre autres le marqueur de sélection nutritionnelle *LEU2* exprimé dans la levure, un marqueur de sélection ampicilline exprimé chez la bactérie ainsi qu'un site de clonage multiple.

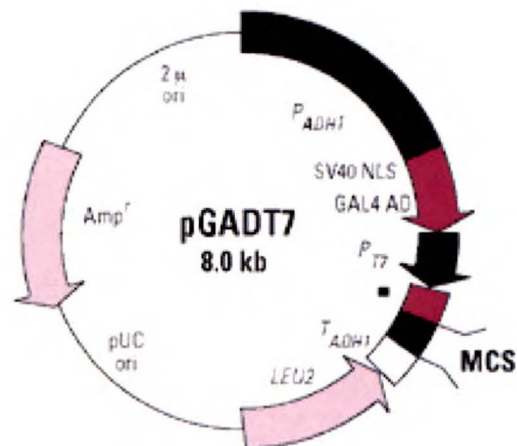
Le vecteur de levure pGBKT7 permet quant à lui, l'expression d'une protéine, dans le cas présent SHP-1, en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de GAL4. Tout comme le vecteur précédent, il contient un marqueur de sélection nutritionnelle *TRP1* chez la levure et un marqueur de sélection kanamycine chez la bactérie ainsi qu'un site de clonage multiple (schéma 10).

### 10.2. Clonage de SHP-1 sauvage dans le vecteur pGBKT7.

L'ADNc de SHP-1 sauvage a été amplifié par la méthode de PCR. Des sites de coupure par des enzymes de restriction ont été ajoutés aux deux extrémités afin de permettre l'insertion du cDNA dans le vecteur. L'amorce sens 5'GGATTCCATATGATGGTGAGGTGGTTTCAC3' (Invitrogen, Burlington, ON), comprenant



▲ c-Myc epitope tag



■ HA epitope tag

**Schéma 10. Vecteurs d'expression du système de double hybride.**  
Tiré du catalogue de Clontech

un site de restriction ajouté *NdeI* (en gras), a été utilisée. L'amorce inverse, à laquelle a été ajoutée le site de restriction *EcoRI* (en gras), possédait la séquence suivante 5'GGTTCTCTCAAGAGGAAGTGAGAATTCCAT 3'. Le PCR a été effectué avec un  $T_m$  calculé de 54°C et 25 cycles ont été nécessaires à l'amplification avec la polymérase purifiée Pfu (Roche Diagnostics, Laval, Québec). Le produit de PCR obtenu a ensuite été validé par digestion enzymatique, purifié sur gel d'agarose et inséré dans le vecteur d'expression par les techniques usuelles de clonage.

### 10.3. Transformation dans les levures.

Les levures ont été transformées par la méthode utilisant l'acétate de lithium, d'après le protocole initial de Transy et Legrain (1995). Brièvement, la souche *Y187* de *Saccharomyces cerevisiae* a été inoculée dans 50 ml de milieu YPD contenant 20 g/l Difco Peptone (Difco Laboratories, Nepean, ON), 10 g/l Yeast extract (Difco Laboratories, Nepean, ON) supplémenté 2 % de glucose après autoclave. Les levures ont été incubées à 30°C/ 225 rpm durant 24-48 hrs. Lorsque la culture a atteint une densité  $0.5 < D.O_{600} > 1.0$  / ml, elle a été centrifugée à 1 500 rpm 5 min, puis le culot a été lavé avec 50 ml d'eau stérile. Le culot résultant a ensuite été lavé avec 5 ml d'une solution LiAc/TE (0.1 M LiAc, 10 mM Tris-HCl pH 8.0) et resuspendu dans 250 µl de la solution LiAc/TE. Dans un tube de 1.5 ml, 1 µg du plasmide pGBKT7/SHP-1 ainsi que 50 µg d'ADN de sperme de saumon soniqué et dénaturé ont été ajoutés à 50 µl de la suspension de levures et de 400 µl d'une solution 40% polyéthylène glycol/LiAc/TE. Le tout a été incubé 30 min à 30°C puis 45 µl de DMSO 100% a été ajouté suivi ensuite



d'une seconde incubation à 42°C 15 min. Les levures transformées ont ensuite été culottées, lavées avec de l'eau stérile, resuspendues dans 100 µl H<sub>2</sub>O et étalées sur milieu restrictif TRP- solide constitué de 1.25 g/l de sulfate d'ammonium (Difco Laboratories, Neapan, ON), 0.675 g/l de Yeast Nitrogen Base, 0.32 g/l du Drop Out TRP-, 20 g/l d'agar et de 4 % glucose ajouté après autoclave.

#### 10.4. Vérification de l'expression de la protéine SHP-1 dans la levure.

Une des colonies issues de la transformation a été prélevée et inoculée dans 10 ml de milieu restrictif liquide Trp-, à 30°C durant la nuit ou jusqu'à une densité à 600 nm entre 0.4 et 0.6. Les levures ont ensuite été culottées à 1000 g, 5 min. Le culot a été lavé avec de l'eau stérile puis resuspendu dans 100 ml de TCA buffer (20 mM de Tris HCl pH8, 50 mM d'acétate d'ammonium, 2 mM EDTA.) La suspension de levures a ensuite été transférée dans des tubes en verre dont le fond a été recouvert de billes de verre. Les tubes ont ensuite été vortexés 20 fois 30sec en remettant dans la glace entre chacun des cycles de vortex. Les surnageants résultants ont été récupérés et mis dans un eppendorf froid. Le tout a par la suite été centrifugé à 12 000 rpm 5 min à 4°C, puis le surnageant a été éliminé. 300 µl de tampon Laemmli 4X a ensuite été ajouté au culot, puis chacun des échantillons a été chauffé à 100°, puis soniqué 10 sec. Les échantillons ont été dosés selon la méthode de Lowry et mis sur gel en vue de vérifier l'expression de la protéine de fusion par immunobuvardage Western Blot (voir section 5.1).

#### 10.5. Test d'interaction avec la librairie de Caco-2/15.

Les levures exprimant la protéine SHP-1 en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 ont été inoculées dans un milieu restrictif liquide Trp- contenant 6.7 g/l Yeast Nitrogen Base (Difco Laboratories, Nepean, ON), 0.32 g/l d'un mélange d'acides aminés déficient en Trp- pour permettre la sélection souhaitée et 2 % glucose après l'autoclave. Cette culture a été incubée à 30°C durant une nuit sous une agitation de 250-270 rpm ou jusqu'à une DO<sub>600</sub> supérieure à 0.8. Par la suite, la culture a été culottée à 600 g durant 5 min, débarrassée de son surnageant et resuspendue dans 5 ml de milieu restrictif liquide Trp-. Ce 5 ml de levures exprimant SHP-1 a ensuite été ajouté à 1ml d'une librairie de levures construite à partir de la souche *AH109* de *Saccharomyces cerevisiae*. Cette dernière a été constituée à partir de cDNA issus de cellules Caco-2/15 insérés en fusion avec le domaine de transactivation de GAL4 dans le vecteur pGADT7. Les deux souches de levures ont été ajoutées à 45 ml de milieu YPD 2X (40 g/l Bacto Peptone, 20 g/l Yeast Nitrogen Base (Difco Laboratories, Nepean, ON) et 4 % glucose après autoclave) dans un erlenmeyer de 2 l et incubées à 30°C sous agitation légère 30-50 rpm. Cette étape permet la conjugaison des levures et l'échange de leur matériel génétique. Ceci permet la formation du facteur de transcription GAL4 fonctionnel lorsqu'il y a intraction entre les protéines de fusion. La culture a ensuite été culottée à 1000 g 10 min, puis lavée à l'eau 2 fois. Finalement, les levures ont été resuspendues dans 10 ml d'eau stérile et étalées sur des milieux agar restrictif Trp-, Leu-, His- et Ade- (0.60 g/l) dans des pétris de 160mm. Les levures qui auront échangé leur matériel génétique lors de la conjugaison seront celles dont le domaine de transactivation et le

domaine de liaison à l'ADN auront interagit. Les promoteurs des gènes de sélection *Trp*, *Leu*, *His*, *Ade* se trouvent sous le contrôle de GAL4. De cette façon, seules les levures où il y aura interaction protéique entre les différents domaines seront en mesure de croître sur un milieu déficient pour les 4 acides aminés. Afin de permettre l'apparition des levures exprimant les protéines qui interagissent, les boîtes de pétri ont été placées à 30°C durant un minimum de 5 jours.

#### 10.6. Extraction de l'ADN des clones sélectionnés.

Après l'apparition des colonies sur les milieux restrictifs, chacun de ces clones a été prélevé et inoculé dans 5 ml de milieu restrictif liquide *Trp*-. Suite à une incubation de nuit à 30°C, les levures ont été centrifugées 2 min à 13000 rpm puis resuspendues dans 250 µl de Resuspension Buffer (2.5 M LiCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 4 % Triton, 62.5 mM EDTA). 250 µl de phénol-chloroforme ainsi que l'équivalent de 30 µl de petites billes de verre ont été ajoutés à la resuspension de levures. Les tubes ont ensuite été vortexés et centrifugés 1 min à 13 000 rpm. Après avoir récolté la phase supérieure, un volume de phénol-chloroforme y a été ajouté et une centrifugation de 10 min à 13 000 rpm a ensuite été effectuée. Le surnageant résultant a par la suite été précipité avec 2 volumes d'éthanol 100 %, puis placé à -80°C durant 20 min suivi d'une centrifugation de 10 min à 13 000 rpm. Finalement, le culot a été lavé 2 fois à l'éthanol 70% puis le culot a été séché à l'air libre puis resuspendu dans 30 µl d'eau stérile.

### 10.7. Amplification et identification de l'ADN issu de la librairie.

L'ADN plasmidique de chacun de clones sélectionnés a par la suite été transformé dans des bactéries électrocompétentes. Cette étape est nécessaire à l'amplification de l'ADN plasmidique issu de la librairie en vue de l'identification des clones sélectionnés. Brièvement, 2 µl issus de chacun des ADN recueillis a été mis en présence de 40 µl de bactéries de la souche *BL21* d'*Escherichia Coli* électrocompétente dans une cuvette conçue à cet effet. Cette dernière a par la suite été montée sur un appareil à électroporation, puis immédiatement après l'impulsion, 1ml de milieu SOC (2% Bactotryptone, 0.5 % Yeast extract (Difco Laboratories, Nepean, ON), 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glucose) a permis de resuspendre les bactéries. Ces dernières ont par la suite été placées à 37°C sous agitation durant 1 hre. Finalement, au terme de l'incubation, 200 µl de suspension bactérienne a été étendu sur milieu LB Agar 32 g/l contenant de l'ampicilline 5 mg/ 100 ml et les pétris ont été placés à l'incubateur durant la nuit. Ceci a permis l'amplification du plasmide contenant le domaine de transactivation contenu dans le plasmide pGADT7. Puis, suite à l'apparition de colonies, des préparations d'ADN issus de chacun des clones ont été effectuées selon les techniques usuelles de purification de l'ADN. Finalement, chacun des ADN obtenus a été digéré par les enzymes de restriction *EcoRI* et *BamHI* contenues dans le site de clonage multiple. Cette étape a permis de vérifier la taille des inserts contenus dans les plasmides issus de la librairie et ayant interagit avec SHP-1. Puis, ces mêmes ADN ont par la suite été retransformés dans les levures *A187* (section 10.3) puis, les levures étalées sur milieu

Leu- dans le but de vérifier la présence d'artéfact. L'ADN obtenu, correspondant à des séquences de protéines, a été séquencé en utilisant l'oligonucléotide T7 fournit avec le système de double hybride (Clontech, Palo Alto, USA). Les séquences obtenues (University Core DNA & Protein Services, University of Calgary, Canada) ont été associées à des protéines en utilisant le logiciel Blast 2.0 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

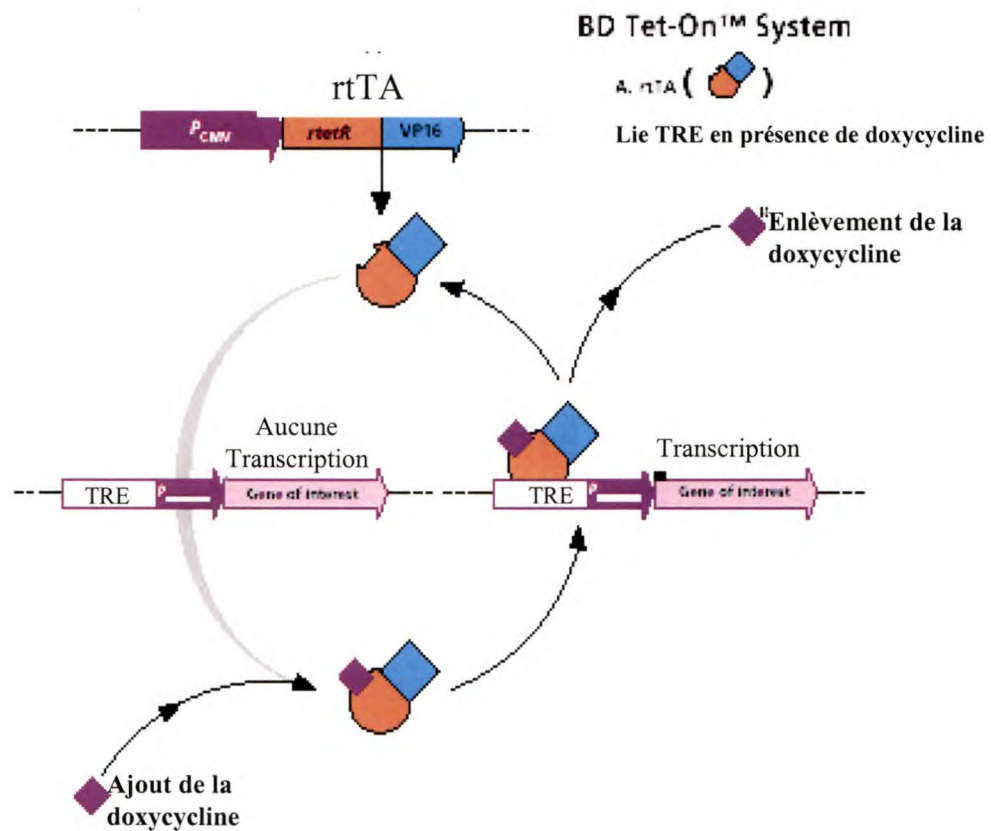
## **11. Infection rétrovirale de SHP-1 sous le contrôle d'un promoteur inductible**

Les infections rétrovirales sous le contrôle d'un promoteur inductible ont toutes été effectuées au moyen du RevTet<sup>TM</sup> System de Clontech (Palo Alto, USA)

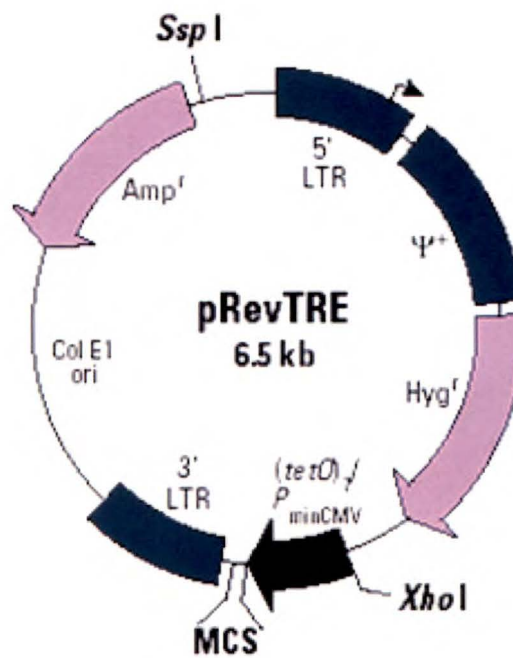
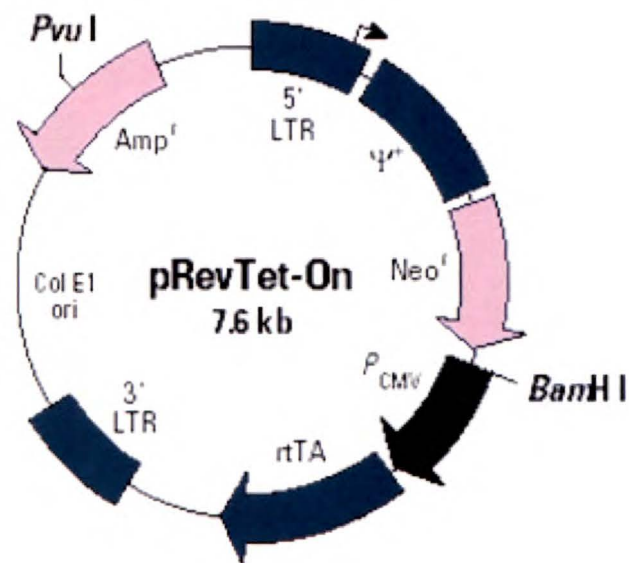
### **11.1. Vecteurs d'expression.**

Le système de promoteur inductible est basé sur l'utilisation de l'opéron tet de *E.coli*. Brièvement dans ce système, le gène à cloner est inséré dans un vecteur en aval d'un élément de réponse à la tétracycline (TRE). En présence de doxycycline (un analogue de la tétracycline), la protéine rtTa lie l'élément TRE activant la transcription du gène d'intérêt (schéma 11).

Le vecteur pREVTet-On est un vecteur rétroviral exprimant un élément de transactivation sensible à la tétracycline rtTA sous le contrôle d'un promoteur constitutif CMV. Il contient une résistance à la néomycine chez les eucaryotes et à l'ampicilline chez *E.coli*.



**Schéma 11. Principe de l'induction d'une protéine avec le système pRevTet-On.**  
Tiré du catalogue de Clontech



**Schéma 12. Vecteurs rétroviraux pour le système inductible.**  
Tiré du catalogue de Clontech

Le vecteur pRevTRE quant à lui exprime une protéine d'intérêt sous le contrôle d'un élément de réponse à la tétracycline (TRE). Le TRE comprend 7 répétitions directes de l'opéron tetO reconnues par la protéine rtTa en présence de doxycycline. Ce vecteur contient une résistance à l'hygromycine B chez l'eucaryote et à l'ampicilline chez la bactérie (schéma 12).

#### 11.2. Clonage de SHP-1 sauvage et C/S dans le vecteur pRevTRE.

Les ADNc de SHP-1 sauvage (SHP-1 WT) et du mutant catalytiquement inactif C/S (SHP-1C/S) ont été amplifiés par la méthode de PCR. Des sites de coupure par des enzymes de restriction ont été ajoutés aux deux extrémités afin de permettre l'insertion des ADNc dans le vecteur rétroviral. L'amorce sens 5'CCCAAGCTTATGGTGAGGTGGTTTCAC 3' (Invitrogen, Burlington, ON), comprenant un site de restriction ajouté HindIII (en gras) a été utilisée. L'amorce inverse, à laquelle a été ajouté le site de restriction ClaI (en gras), possédait la séquence suivante 5'GGTTCTCTCAAGAGGTGAATCGATGG 3'. Le PCR a été effectué avec un Tm calculé de 54°C et 25 cycles ont été nécessaires à l'amplification avec la polymérase purifiée Pfu (Roche Diagnostics, Laval, Québec). Les produits de PCR obtenus ont ensuite été validés par digestion enzymatique, purifiés sur gel d'agarose et insérés dans le vecteur d'expression par les techniques usuelles de clonage.



### 11.3. Production du rétrovirus dans les cellules HEK293.

Les cellules HEK293 ont étéensemencées dans des boîtes de pétri de 100 mm dans les conditions énumérées ci-haut et portées à une confluence de 50-75 %. 60 µl de LipofectAMINE 2000 a été ajouté à 750 µl de milieu Opti-MEM puis incubé pendant 5min à température ambiante. Durant l'incubation, les vecteurs nécessaires à la production de virus infectieux et fonctionnels dont 10 µg d'ADN pVPack-GP (capside virale) et 10 µg pVPack-VSV (protéine de capsid virale) (Stratagene, CA, USA) ainsi 10 µg du vecteur rétroviral pRevTet-On ou pRevTRE contenant la protéine SHP-1 WT ou C/S ont été ajoutés à 750 µL d'Opti-MEM. La solution contenant l'agent de transfection a, par la suite, été mise en présence de la préparation d'ADN suivie d'une incubation de 30 min à température de la pièce. Les cellules à transfecter ont été rincées au PBS 1X et mises en présence de 5 ml de milieu Opti-MEM sans sérum. Finalement, le 1.5 ml du mélange à transfection a été ajouté à chacun des pétris. Ces derniers ont été remplacés à l'incubateur pour 4 hrs afin de permettre la transfection. Après quoi, les cellules ont de nouveau été débarrassées de leur milieu pour être mises présence de milieu DMEM contenant 10 % FBS (section 3.4) durant 2 jours. Les virus produits par les cellules se retrouvent alors dans le surnageant. Afin de le recueillir, il a été passé à travers un filtre 0.45 µm MILLEX®-HA (Millipore, Nepan, Canada). Les surnageants ont ensuite été congelés en aliquots de 1.5 ml jusqu'à l'infection ultérieure.

#### 11.4. Infection des cellules HIEC avec pRevTet-On et pRevTRE SHP-1WT et pRevTRE SHP-1C/S.

Un jour avant l'infection, les cellules HIEC ont été ensemencées dans des pétris de 60 mm dans un milieu Opti-MEM contenant 5 % FBS de façon à avoir une densité de 60-75% lors de l'infection. Aux aliquots de virus pRevTetOn fraîchement dégelés a été ajouté du polybrène à une concentration de 4 µg/µl. L'ajout de ce composé est nécessaire afin de neutraliser les charges contenues sur la membrane plasmique permettant ainsi l'approche du virus. Le milieu des cellules à infecter a été retiré et remplacé par 1.5 ml de suspension virale contenant le polybrène. Après une incubation de 1 hre à 37°C, 3 ml de milieu Opti-MEM 5 % FBS contenant 4 µg/µl de polybrène, 2 mM glutamine, pénicilline 100 U/ml et insuline 100 U/ml a été ajouté aux cellules contenant déjà la suspension virale. Le tout a été remplacé deux jours à l'incubateur pour ensuite être mis dans un milieu DMEM supplémenté de néomycine 250 µg/ml pour sélectionner les cellules infectées durant 10 jours. Les cellules HIEC pRevTet-On résistantes ont ensuite subi une seconde infection avec les virus pRevTRE SHP-1WT et pRevTRE SHP-1C/S comme mentionné précédemment, mais avec une sélection à l'hygromycine B 50 µg/ml. Les populations stables HIEC doublement infectées ont ensuite été cultivées normalement (voir section 3.1). Afin d'induire l'expression de la protéine, les cellules portées au stade de confluence désiré, ont été mises en présence de doxycycline 5 µg/ml (Clontech, Palo Alto, USA) durant le temps souhaité.

## 12. Essai kinase CDK2

Les cellules HEK293 transfectées avec les différentes constructions de SHP-1 ont été lysées dans un tampon Triton. SHP-1 a ensuite été immunoprécipitée à partir de 500 µg de protéines (voir section 6). Après avoir été lavés dans un tampon kinase (20 mM MOPS pH 7.2, 75 mM  $MgCl_2$ , 20 mM  $\beta$ -glycérophosphate, 5 mM EGTA, 1 mM orthovanadate, 1 mM DTT, 10 mM pNPP), les immunocomplexes ont été resuspendus dans 40 µl de tampon kinase complémenté de 500 µM d'ATP froid et de 2 µCi d'ATP[ $\gamma$ - $^{32}P$ ]. 40 ng de protéine recombinante cycline E/ CDK2 (Transduction Laboratories, Mississauga, ON) active avec ou sans 50 µM de l'inhibiteur de CDK2, rosovitine (Sigma Aldrich, USA), ont été ajoutés. Le tout a été incubé à 30°C, 30 min et la réaction a été terminée par l'ajout de 13.3 µl de Laemmli 4X. Les échantillons chauffés 5 min à 100°C ont été déposés sur gel SDS-PAGE 12.5 %. SHP-1 phosphorylée a été visualisée par autoradiographie.

## **CHAPITRE III**

### **RÉSULTATS**

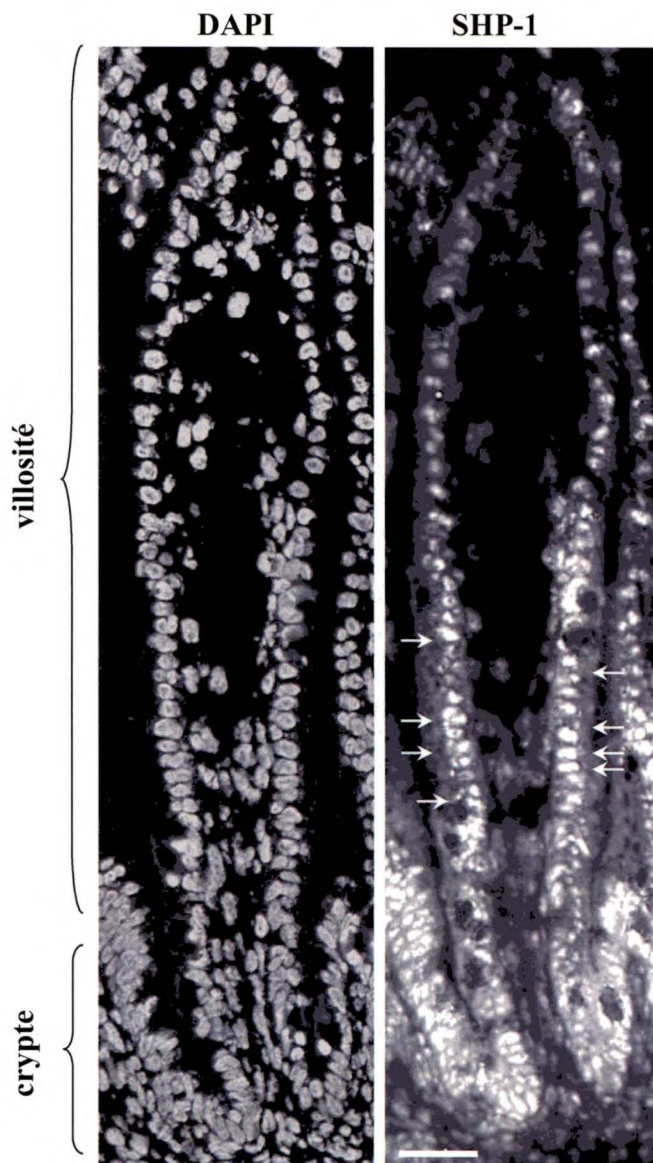
#### **1. Localisation de la protéine SHP-1 dans le côlon et le jéjunum de l'intestin foetal**

Dans un premier temps, nous avons analysé, dans l'intestin foetal humain, la localisation de la protéine SHP-1. L'utilisation d'un anticorps spécifique contre SHP-1 en immunofluorescence a démontré que cette phosphatase se localisait principalement dans le noyau de toutes les cellules du jéjunum et du côlon (fig. 1A et B). Dans le jéjunum par contre, un plus fort marquage de la protéine est observé dans le tiers inférieur de la villosité (fig. 1A voir flèches) alors que dans le côlon, ce phénomène est observé dans le milieu de la crypte (fig. 1B voir flèches).

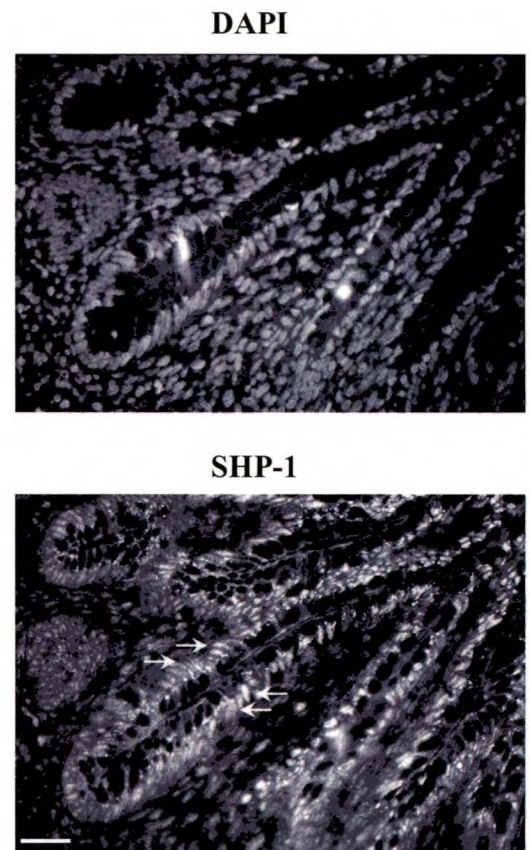
#### **2. Localisation de la protéine SHP-1 dans les lignées cellulaires épithéliales humaines et de rat aux stades prolifératif et après l'atteinte de la confluence**

Dans les cellules cryptales prolifératives HIEC humaines et IEC-6 chez le rat, l'immunofluorescence indirecte avec SHP-1 a démontré que la protéine était surtout localisée au noyau dans toutes les cellules (fig. 2A et B, à gauche). Cependant, à l'atteinte de la confluence, on note une légère augmentation de la protéine dans le cytoplasme, bien que le marquage nucléaire prédomine toujours (fig. 2A et B, à droite). Nous avons ensuite analysé la localisation de la protéine SHP-1 dans les cellules

## A. Jéjunum



## B. Côlon



**Figure 1. Localisation de SHP-1 dans l'intestin fœtal humain.**

Des coupes de jéjunum (A) et de côlon (B) d'intestin fœtal âgé entre 18-20 semaines ont été incubées avec un anticorps dirigé contre SHP-1 pour procéder à une immunofluorescence indirecte. Les noyaux de toutes les cellules ont été marqués au DAPI. Barres = 20µm. Résultat représentatif de 3 expériences indépendantes.

**A. HIEC**

Sous-confluentes

jr 2 de post-confluence



**B. IEC-6**

Sous-confluentes

jr 2 de post-confluence



**C. Caco-2/15**

Sous-confluentes

jr 2 de post-confluence



**Figure 2. Localisation de SHP-1 dans les lignées cellulaires épithéliales intestinales humaines et de rat.**

Les cellules HIEC (A), IEC-6 (B) et Caco2/15 (C) prolifératives et 2 jours après l'atteinte de la confluence ont été fixées au méthanol/acétone, perméabilisées avec 0.1% Triton et incubées en présence d'un anticorps anti-SHP-1 en vue d'une immunofluorescence indirecte. Résultats représentatifs de 3 expériences indépendantes. Barres: 20  $\mu$ m.

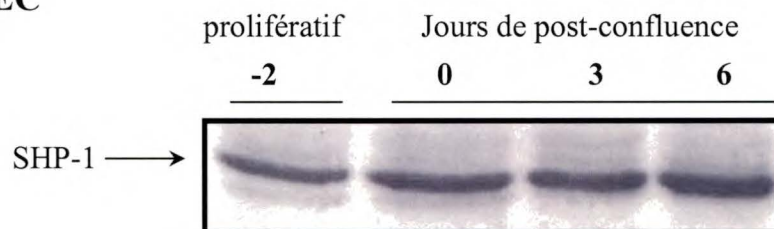
Caco-2/15, capables de différenciation entérocytaire à l'atteinte de la confluence. Comme dans les autres modèles cellulaires au stade prolifératif, SHP-1 est principalement nucléaire (fig. 2C, à gauche). Bien que 2 jours après la confluence, SHP-1 soit toujours majoritairement nucléaire, on peut observer un léger marquage cytoplasmique (fig. 2C, à droite).

### **3. Analyse de l'expression et de l'activité de SHP-1 dans les cellules épithéliales intestinales durant l'arrêt du cycle cellulaire et la différenciation**

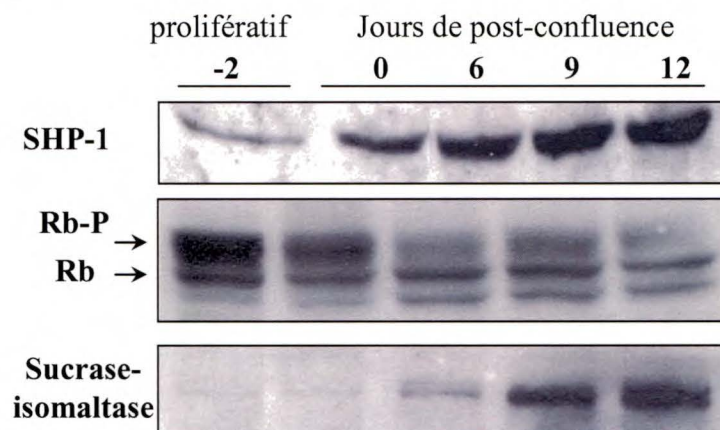
L'expression ainsi que l'activité de SHP-1 ont été analysées dans les cellules HIEC, des cellules normales de la crypte intestinale capables d'arrêter leur prolifération à l'atteinte de la confluence. Lysées à différents stades de confluence dans un tampon Triton, on observe par immunobuvardage après analyse densitométrique, que l'expression de SHP-1 demeure relativement constante, quoiqu'une légère augmentation de 1.3 fois soit notée à l'atteinte de la confluence (fig. 3A) et de 1.7 fois au jr 6 post-confluence. Nous avons ensuite tenté de doser l'activité de la phosphatase pour déterminer si son expression corrélait avec son activité. À partir des mêmes lysats, SHP-1 a été immunoprécipitée puis préparée en vue d'un essai phosphatase en utilisant un phosphopeptide spécifique. La figure 4A montre que l'activité spécifique de SHP-1 n'est que très légèrement modulée par l'arrêt de prolifération. En effet, cette activité passe de 1.1 fois au jr 0 pour ensuite passer à 1.2 fois après 6 jours de confluence et ce, avec un même taux de protéine SHP-1 immunoprécipité (fig 4A, en bas). Donc, l'activité, mais



### A. HIEC



### B. Caco-2/15

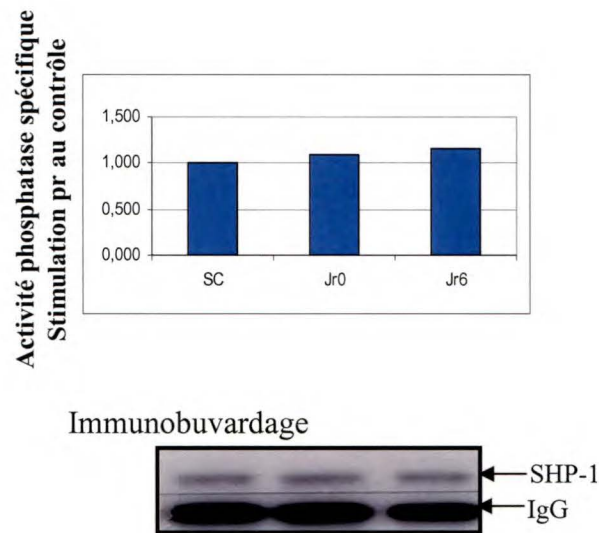


**Figure 3. Expression de SHP-1 dans les lignées cellulaires en arrêt de prolifération.**

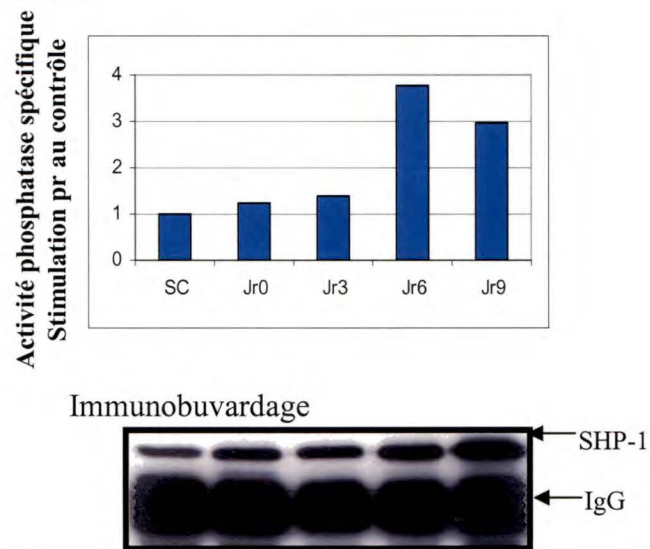
(A) Les cellules HIEC ont été lysées dans un tampon Triton à 70% de confluence (prolifératif) et à 100% de confluence (jr 0) et à 3 et 5 jours après la confluence. 40 µg d'extrait protéique ont été séparés par gel 10 % SDS-PAGE et l'expression de SHP-1 a été analysée par immunobuvardage Western Blot. (B) Les cellules Caco-2/15 ont été lysées à 70% (prolifératif) et 100% (jr 0) puis à 6, 9, 12, jours après la confluence. 40 µg de protéines ont été déposés sur gel et analysés par immunobuvardage Western pour les anticorps SHP-1, pRb et sucrase-isomaltase.



## A. HIEC



## B. Caco-2/15



**Figure 4. Activité de SHP-1 dans les lignées cellulaires à différents jours de confluence.**

Les cellules HIEC (A), et Caco-2/15 (B), sous-confluentes (SC) et à différents jours de confluence ont été lysées dans un tampon Triton. SHP-1 a été immunoprécipitée dans chacun des extraits cellulaires (800 µg). L'activité phosphatase a été déterminée en utilisant le phosphopeptide RRLIEDAE<sub>p</sub>YAARG comme substrat. Les niveaux de SHP-1 immunoprécipités ont été analysés par immunobuvardage. L'activité phosphatase spécifique a été déterminée en calculant l'activité par rapport à la quantité relative de SHP-1 immunoprécipitée déterminée par densitométrie. Toutes les activités sont exprimées en pmoles de phosphates libérés/unité de densitométrie par rapport au contrôle sous-confluent (SC) dont la valeur a été normalisée à 1. Une expérience représentative figure pour chacun des modèles cellulaires.

surtout l'expression de SHP-1 sont légèrement augmentées dans les cellules HIEC lors de l'arrêt de prolifération.

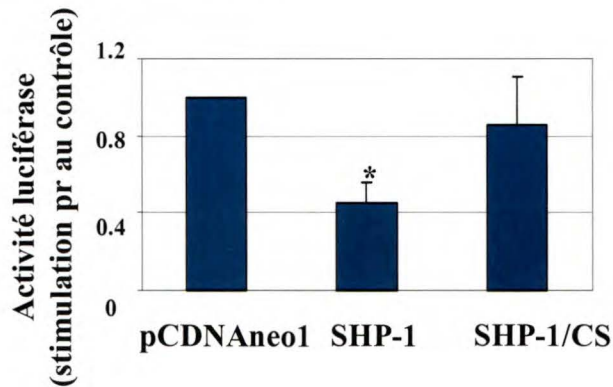
Nous avons ensuite entrepris d'analyser l'expression ainsi que l'activité de SHP-1 dans les cellules Caco-2/15. Rappelons que les cellules Caco-2/15, à l'atteinte de la confluence, cessent leur prolifération et entament leur différenciation. Les cellules ont été portées à différents stades de confluence soit 70% (jr-2), 100% (jr0) et 6, 9, 12 jours après la confluence. L'expression de la protéine SHP-1 a été analysée suite à un immunobuvardage dans ces cellules. La figure 3B démontre bien que l'expression de la protéine est fortement induite dès l'atteinte de la confluence et cette induction s'accroît à travers les jours de confluence. Nous avons ensuite tenté de corréler cette augmentation d'expression avec un arrêt de prolifération et l'induction de différenciation. Des analyses d'immunobuvardage avec p105Rb confirme que la protéine devient hypophosphorylée au jr 0 et de façon plus apparente au 6<sup>ème</sup> jour après la confluence. Sous sa forme hypophosphorylée, pRb séquestre les facteurs de transcription E2F causant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Cet arrêt de prolifération est suivi de près par l'induction de la différenciation visualisée par l'expression du marqueur de différenciation entérocytaire, la sucrase-isomaltase dès le jour 6 (fig. 3B, en bas). L'activité spécifique de SHP-1, déterminée suite à son immunoprécipitation, montre qu'elle atteint un maximum au jour 6 après la confluence (fig. 4B). Dans le cas présent, même si l'expression de SHP-1 est augmentée dès la confluence, l'activité spécifique de la protéine atteint, quant à elle, un maximum au jour 6 après la confluence.

#### 4. Régulation du cycle cellulaire des cellules intestinales par l'expression ectopique de SHP-1

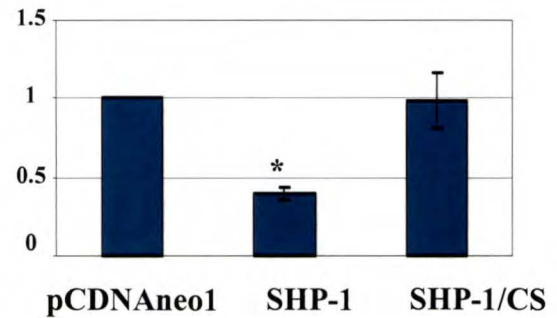
Il est connu que SHP-1 peut réguler négativement la prolifération cellulaire de plusieurs types cellulaires (Starr et Hilton, 1999). Comme nous avons observé une légère augmentation de l'expression et d'activité SHP-1 durant l'arrêt de prolifération des HIEC, phénomène surtout accentué dans les des Caco-2/15, nous avons voulu étudier l'effet de sa surexpression sur la progression du cycle cellulaire des cellules intestinales. Pour ce faire, nous avons procédé à des transfections des 2 constructions de SHP-1, soit SHP-1 sauvage (SHP-1WT) et SHP-1 catalytiquement inactif (SHP-1C/S), en combinaison avec différents gènes rapporteurs. Les cellules HIEC ont été ici utilisées puisqu'il s'agit de cellules normales contrairement aux cellules Caco-2/15 qui elles, sont d'origine cancéreuse.

L'expression du gène de la dihydrofolate réductase (*dhfr*), essentiel à la synthèse des nucléotides lors de la réplication d'ADN, est dépendante de la liaison des facteurs de transcription E2F à son promoteur. Ceci constitue un événement représentatif de la progression G1/S des cellules. Nous avons utilisé le gène rapporteur *dhfr*-luciférase dont le promoteur est sensible aux facteurs de transcription E2F pour reconstituer le comportement des cellules durant la transition G1/S. Dans un premier temps, les 2 constructions de SHP-1 ainsi que le vecteur vide pcDNAneo1 ont été testés sur ce gène rapporteur. Les résultats montrent, à la figure 5A, que l'expression de SHP-1 WT, mais pas du mutant SHP-1 C/S, inhibe d'environ 60% l'expression du gène rapporteur *dhfr* par

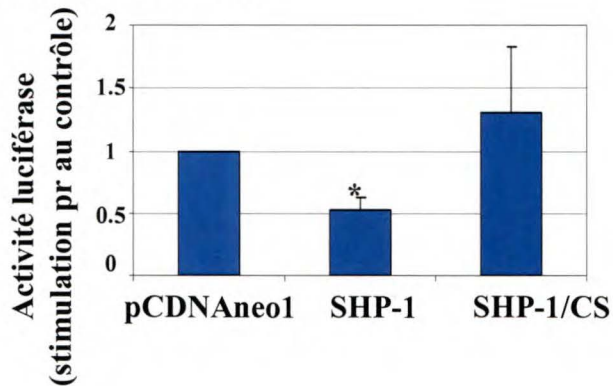
**A. *DHFR*-luciférase**



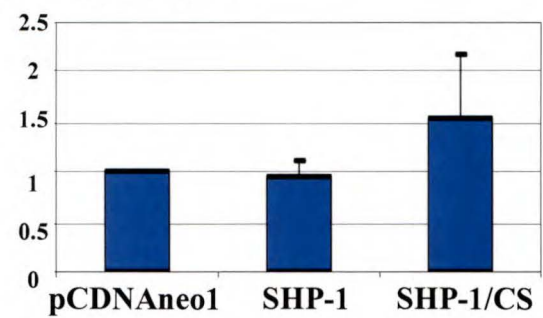
**B. *Cycline D1*-luciférase**



**C. *c-Myc*-luciférase**



**D. *c-Fos*-luciférase**



**Figure 5. Effet de la surexpression ectopique de SHP-1 sauvage et dominant négatif sur les gènes rapporteurs *DHFR*, *cycline D1*, *c-myc*, et *c-fos* dans les cellules HIEC.**

Les cellules HIEC sous-confluentes ont été cotransfectées avec 0.2  $\mu$ g de pcDNAneo1 contenant ou non les inserts codant pour SHP-1 sauvage (WT) ou SHP-1C453S dominant négatif (SHP-1C/S) et 0.2 $\mu$ g de chacun des gènes rapporteurs de la *DHFR* (A), *cycline D1* (B), *c-myc* (C) et *c-fos* (D). 48 heures après la transfection, l'activité luciférase a été mesurée dans ces cellules. Les résultats sont exprimés relativement au vecteur vide pcDNAneo1 dont la valeur a été normalisée à 1. Les \* indiquent les valeurs significativement différentes du contrôle pour 3 expériences indépendantes ( $0.001 \leq p \leq 0.01$ ).

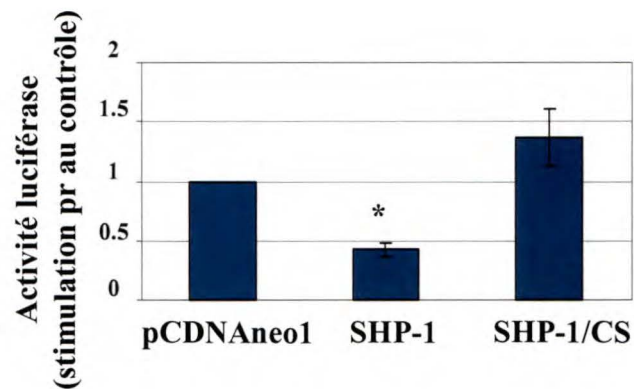
rapport au contrôle vecteur vide pcDNAneo1. Ceci suggère que SHP-1 parvient à réguler négativement la progression du cycle cellulaire des cellules intestinales.

Afin de mieux caractériser le rôle de SHP-1 dans la progression du cycle cellulaire, nous avons cherché à savoir si elle pouvait parvenir à inhiber l'expression d'autres cibles spécifiques de la phase G1. Plus spécifiquement, nous avons étudié l'effet de la surexpression de SHP-1 sur les gènes rapporteurs *cycline D1*-luciférase et *c-myc*-luciférase. Ces gènes rapporteurs contiennent la partie minimale des promoteurs respectifs clonée en aval du gène de la luciférase. La cycline D1 et c-myc sont 2 protéines dont l'expression est rapidement augmentée lors de la progression en phase G1 suite à une stimulation par des facteurs de croissance (Sherr, 1994 ; Chiariello et al., 2001). Nous avons donc procédé à une cotransfection des 2 constructions de SHP-1 avec chacun des gènes rapporteurs *cycline D1*-luciférase et *c-myc*-luciférase. Leurs expressions ont été significativement atténuées de 55 et 49 % respectivement en présence de SHP-1 WT, alors qu'aucun effet significatif n'a été observé avec le mutant inactif (fig. 5, B et C).

L'activation de la voie des MAPKs p42/p44 constitue un événement important dans la progression du cycle cellulaire de différents types cellulaires (Peyssonnaud et Eychene, 2001). Une des réponses cellulaires amenée par l'activation des MAPKs en réponse aux facteurs de croissance est l'induction du facteur de transcription c-fos (Angel et Karin, 1991). Nous avons donc tenté d'analyser l'effet de la surexpression des 2 constructions de SHP-1 sur le gène rapporteur *c-fos*-luciférase. Comme montré à la figure 5D, ni SHP-1 WT ni le mutant catalytiquement inactif SHP-1 C/S n'ont eu d'effet

significatif sur l'expression du gène rapporteur *c-fos*-luciférase par rapport au contrôle pcDNAneo1. Ceci suggérait, par le fait même, que SHP-1 n'interférait pas avec l'activation des MAPKs p42/p44.

Comme SHP-1 semblait inhiber le passage des cellules en phase S (visualisé par *dhfr*-luciférase) ainsi que l'expression des gènes *cycline D1* et *c-myc*, nous nous sommes attardés aux voies de signalisation contrôlant leur expression. Notre attention s'est portée sur 3 voies de signalisation principales. La première, la voie des MAPKs, est connue pour stimuler la croissance cellulaire en provoquant à la fois l'induction de la cycline D1 (Lavoie et al., 1996) et de *c-myc* (Misawa et al., 2000). Cependant, la transfection transitoire avec le gène rapporteur *c-fos*, dont l'expression est contrôlée par les MAPKs, indique que SHP-1 n'a probablement aucun effet sur cette signalisation. Nous avons ensuite considéré la voie des NF $\kappa$ B, également rapportée pour provoquer la prolifération cellulaire via l'induction de la cycline D1 (Guttridge et al., 1999) et *c-myc* (Duyao et al., 1992). Nous avons cependant écarté la possibilité que SHP-1 pouvait médier son effet en interférant avec NF $\kappa$ B étant donné que cette signalisation est surtout décrite dans les cellules du système immunitaire. Il est connu, dans les cellules épithéliales intestinales, que la voie  $\beta$ -caténine/TCF est impliquée dans la régulation des protéines *c-myc* et *cycline D1* (Kolligs et al., 2002). La possibilité que SHP-1 puisse réguler ces deux gènes en interférant avec l'activation la voie  $\beta$ -caténine/TCF nous a particulièrement intéressés. Les cellules HIEC sous-confluentes ont donc été transfectées avec le gène rapporteur



**Figure 6. Effet de la surexpression ectopique de SHP-1 sauvage et dominant négatif sur le gène rapporteur TOP-FLASH.**

Les cellules HIEC sous-confluentes ont été cotransfectées avec 0.2  $\mu$ g de pcDNAneo1 contenant ou non les inserts codant pour SHP-1 sauvage (WT) ou SHP-1C453S dominant négatif (SHP-1C/S) et 0.2  $\mu$ g du gène rapporteur TOP-FLASH. 48 heures après la transfection, l'activité luciférase a été mesurée dans ces cellules. Les résultats sont exprimés relativement au vecteur vide pcDNAneo1 dont la valeur a été normalisée à 1. Les \* indiquent les valeurs significativement différentes du contrôle pour 3 expériences indépendantes ( $0.001 \leq p \leq 0.01$ ).

TOP-FLASH ainsi qu'avec les différentes constructions de SHP-1. Ce gène rapporteur contient dans son promoteur, 4 éléments de liaison aux facteurs de transcription TCF couplés à la luciférase, ce qui permet donc de visualiser les capacités transcriptionnelles de la voie. À cet effet, la présence de SHP-1 WT provoque une diminution de 58 % de la transcription du gène rapporteur TOP-FLASH comparativement au contrôle pcDNAneo1, alors que le mutant SHP-1 C/S semble la stimuler légèrement (fig. 6A).

## **5. Association entre SHP-1 et $\beta$ -caténine dans les cellules intestinales HIEC et IEC-6**

Les résultats précédents semblaient suggérer que SHP-1 peut contrôler négativement la voie  $\beta$ -caténine/TCF. Rappelons que la  $\beta$ -caténine est au centre même de la transactivation de la voie. Sa stabilisation cytoplasmique entraîne sa translocation nucléaire. Étant donné la localisation nucléaire de SHP-1 dans nos modèles cellulaires (voir fig. 1 et 2), nous avons tenté de démontrer une interaction entre les 2 protéines. Nous avons donc procédé à une immunoprécipitation de SHP-1 dans les cellules HIEC et IEC-6 sous-confluentes, à l'atteinte de la confluence (jr 0) et 5 jours après la confluence (jr 5). L'association de la  $\beta$ -caténine avec l'immunocomplexe a ensuite été déterminée par immunobuvardage. La figure 7A (en haut) démontre, dans les deux modèles cellulaires, une forte association des 2 protéines à sous-confluence. Cette association est graduellement perdue à mesure que les jours de confluence avancent et ce, même si le taux de SHP-1 immunoprécipité est identique (fig 7A, en bas). Cette diminution d'association n'est pas le résultat d'une diminution de l'expression de la  $\beta$ -caténine. En effet, les immunobuvardages  $\beta$ -caténine réalisés à partir d'extraits totaux des lysats



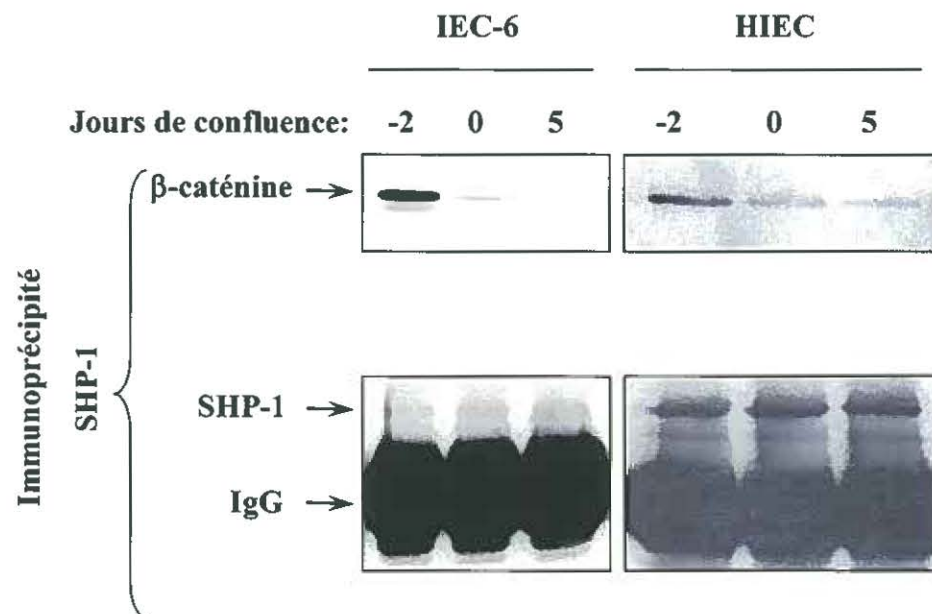
utilisés pour l'immunoprécipitation démontrent une expression constante de la protéine (fig. 7B).

Nous avons ensuite tenté d'expliquer la perte d'association entre les 2 protéines observée après l'atteinte de la confluence. Une de nos premières avenues a été de vérifier leur localisation subcellulaire en fonction de la confluence. La localisation des 2 protéines a donc été analysée par immunofluorescence dans les cellules IEC-6 à différents jours de confluence. Les cellules IEC-6 ont été utilisées, car la localisation nucléaire de la  $\beta$ -caténine est beaucoup plus facile à détecter que dans les cellules HIEC. La figure 8 illustre bien la localisation nucléaire de SHP-1 et de la  $\beta$ -caténine dans les cellules sous-confluentes (jr-2) avec en plus, un fort marquage de la  $\beta$ -caténine aux contacts cellulaires. Bien que SHP-1 demeure en partie nucléaire à l'atteinte de la confluence, la  $\beta$ -caténine est, quant à elle, relocalisée aux contacts cellule-cellule. Ces résultats semblent suggérer que la perte d'association entre la  $\beta$ -caténine et SHP-1 observée en immunoprécipitation est probablement due à une relocalisation de la  $\beta$ -caténine aux contacts cellule-cellule induits suite à l'engagement des cadhérines E.

## **6. Effet de la surexpression de SHP-1 sur la liaison à l'ADN du complexe $\beta$ -caténine/TCF**

Comme nous avons montré une association entre la  $\beta$ -caténine et SHP-1 ainsi qu'une modification de l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine par SHP-1, nous avons voulu élucider le mécanisme. En se basant sur une étude démontrant une

### A. Immunoprécipitation SHP-1

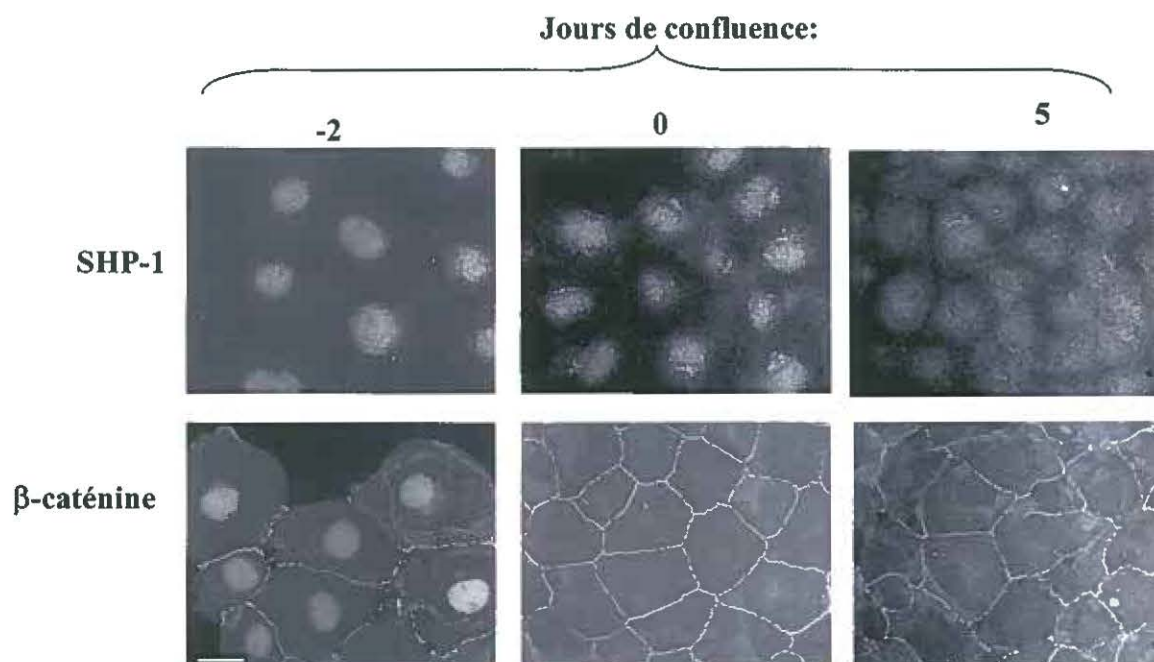


### B. Extraits cellulaires totaux



**Figure 7. Association de SHP-1 et  $\beta$ -caténine dans les cellules épithéliales intestinales.**

(A) SHP-1 a été immunoprécipitée à partir de 800  $\mu$ g de protéines provenant des lysats de cellules HIEC et IEC-6 sous-confluentes et confluentes jr 0 et jr 5. Les protéines immunoprécipitées ont été solubilisées et ensuite séparées sur gel de polyacrylamide 10% SDS-PAGE. Des immunobuvardagades SHP-1 et  $\beta$ -caténine ont été effectués afin de vérifier les niveaux immunoprécipités des 2 protéines. (B) 40  $\mu$ g de lysats totaux provenant des 2 modèles cellulaires ont été déposés sur gel SDS-PAGE 10%. L'expression de  $\beta$ -caténine a été analysée par immunobuvardage avec l'anticorps correspondant.

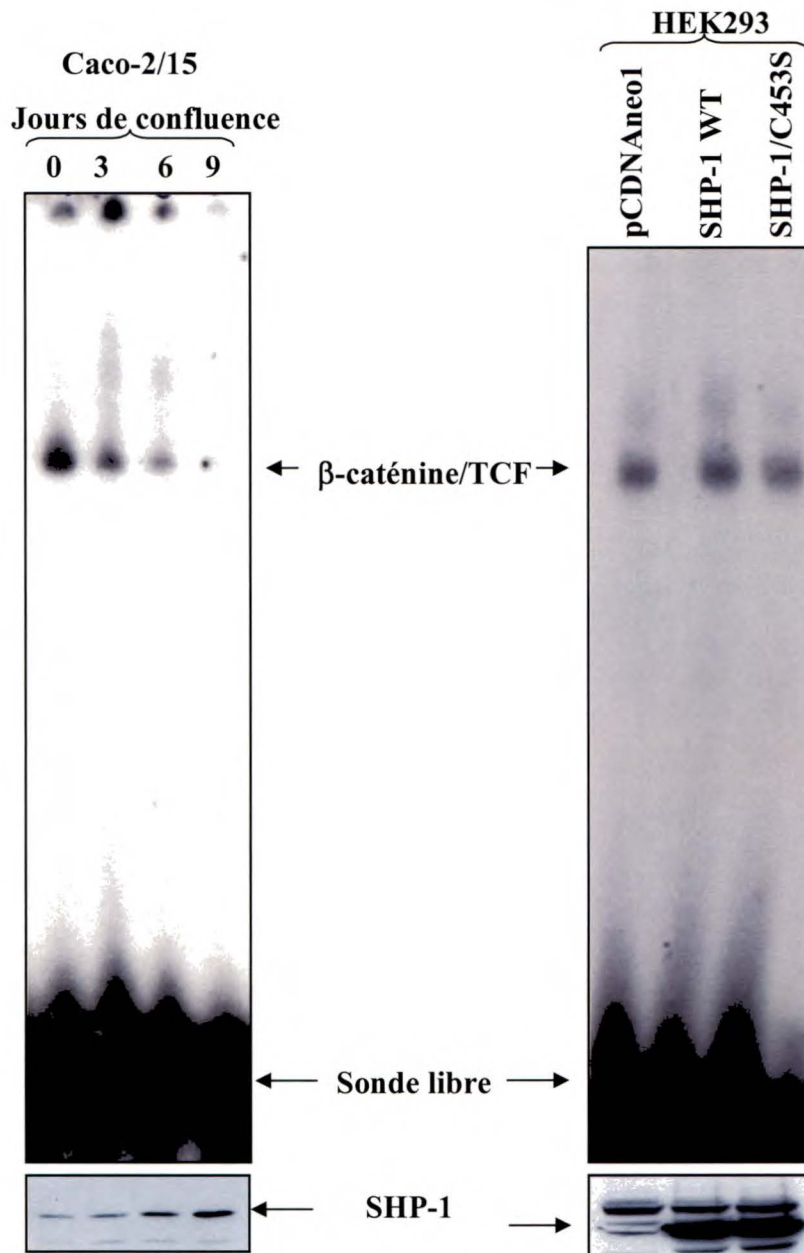


**Figure 8. Colocalisation de SHP-1 et de la  $\beta$ -caténine dans les cellules IEC-6.**

Les cellules IEC-6 sous-confluentes (jr-2) et confluentes (jr 0 et jr 5) ont été fixées avec du méthanol-acétone, perméabilisées avec une solution 0.1% Triton et incubées avec les anticorps dirigés contre SHP-1 et  $\beta$ -caténine en vue d'une immunofluorescence indirecte. Résultats représentatifs de 3 expériences indépendantes. Barre = 20 $\mu$ m.

diminution de la liaison à l'ADN du complexe  $\beta$ -caténine/TCF en fonction de la différenciation de cellules Caco-2 (Mariadason et al., 2001), nous avons postulé que SHP-1 pouvait moduler cette liaison. Nous avons donc répété l'expérience réalisée par ce groupe. Des extraits nucléaires de cellules Caco-2/15, lysés à différents jours de confluence, ont été incubés en présence d'une sonde radioactive possédant les sites de liaison spécifiques pour TCF. Le tout a ensuite été mis sur gel de polyacrylamide et analysé par autoradiographie. La figure 9A montre une diminution de la liaison du complexe  $\beta$ -caténine/TCF en fonction de la confluence. En parallèle, nous avons réalisé, à partir des mêmes lysats de cellules Caco-2/15, un immunobuvardage SHP-1. L'augmentation de l'expression de la protéine SHP-1 corrélait parfaitement avec la diminution de liaison du complexe à l'ADN (fig. 9A, en bas). Ceci suggérait que SHP-1 pouvait potentiellement influencer la liaison à l'ADN du complexe  $\beta$ -caténine/TCF.

Afin de confirmer ou d'infirmer ceci, nous avons surexprimé, dans les cellules HEK293, le vecteur vide pcDNAneo1 seul ou contenant SHP-1 WT et SHP-1 C/S. Des extraits nucléaires ont été préparés à partir de ces cellules, suivi d'une étude de liaison à l'ADN. Malgré la surexpression apparente de SHP-1 dans ces cellules (fig. 9B, en bas), la liaison du complexe  $\beta$ -caténine/TCF n'est pas altérée en présence des différentes constructions de SHP-1 (fig.9B, en haut). SHP-1 ne semble donc pas interférer avec la capacité de liaison à l'ADN du complexe  $\beta$ -caténine/TCF.

**A. Caco-2/15****B. HEK293**

**Figure 9. Liaison à l'ADN du complexe  $\beta$ -caténine/TCF dans les cellules Caco-2/15 et dans les HEK 293 surexprimant SHP-1 sauvage et SHP-1 C/S.**

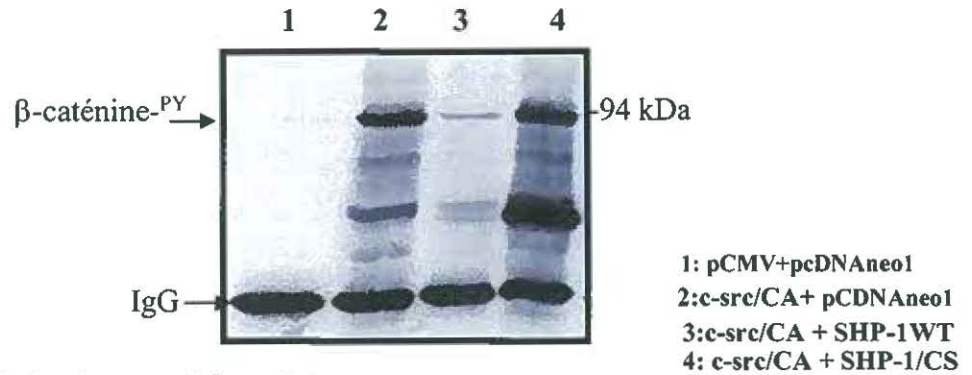
Des extraits de protéines nucléaires ont été préparés à partir des cellules Caco-2/15 à différents jours de confluence (A) et de cellules HEK293 surexprimant différentes constructions de SHP-1 (B). Les extraits nucléaires ont ensuite été incubés avec un oligonucléotide double-brin marqué au  $^{32}\text{P}$  comprenant le site de liaison pour TCF-4. Les complexes ADN-protéines/ADN libre ont été migrés sur gel de polyacrylamide 4% en condition non dénaturante. La formation des complexes a été visualisée par autoradiographie. L'expression de SHP-1, déterminée par immunobuvardage, a été effectuée à partir d'un extrait protéique nucléaire provenant des 2 types cellulaires. Représentatif de n=3 expériences.

## 7. Déphosphorylation sur tyrosine de la $\beta$ -caténine par SHP-1

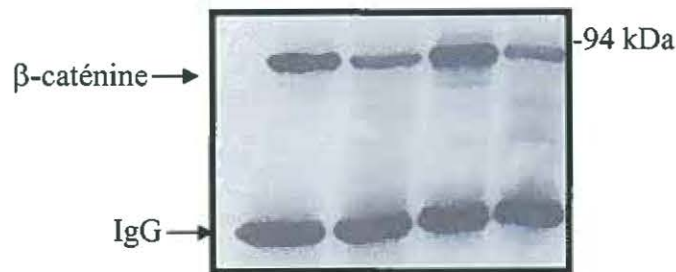
La  $\beta$ -caténine est une protéine qui peut être phosphorylée sur tyrosine. Dans plusieurs types de cancers colorectaux, elle se trouve d'ailleurs fortement phosphorylée sur tyrosine (Pipas et al., 1993). C-src, une tyrosine kinase, est connue pour phosphoryler efficacement la  $\beta$ -caténine *in vitro* (Roura et al., 1999). Nous nous sommes attardés à savoir si SHP-1 pouvait déphosphoryler la  $\beta$ -caténine et ainsi mener à la diminution de sa capacité transcriptionnelle observée par TOP-FLASH. Nous avons donc transfecté, dans les cellules HEK293, une construction de c-src constitutivement actif (c-src CA) en vue d'obtenir de haut taux de phosphorylation sur la  $\beta$ -caténine. Cette construction a été transfectée en combinaison avec pcDNAneo1, SHP-1 sauvage ou SHP-1C/S. Après la transfection, la  $\beta$ -caténine a été immunoprécipitée et le niveau de phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine a été analysé par immunobuvardage pour chacune des conditions. La figure 10A (piste 2) montre que la surexpression de c-src CA provoque une forte augmentation de la phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine endogène. Cependant en présence de SHP-1WT (piste 3), la phosphorylation amenée par c-src est grandement atténuée alors que la co-expression du mutant SHP-1C/S n'a aucun effet (piste 4) et ce, malgré un taux relativement comparable de  $\beta$ -caténine immunoprécipité (fig. 10B). À la figure 10C (piste 4), on peut observer une plus forte association de la  $\beta$ -caténine avec SHP-1C/S qu'avec SHP-1 sauvage. Comme les mutants catalytiquement inactifs des tyrosine phosphatases agissent en trappant leurs substrats (Flint et al., 1997), ceci indique que la  $\beta$ -caténine est un substrat efficace pour SHP-1.



**A. Immunoprécipitation : anti- $\beta$ -caténine**  
**Immunobuvardage anti-PY**



**B. Immunoprécipitation : anti- $\beta$ -caténine**  
**Immunobuvardage anti- $\beta$ -caténine**



**C. Immunoprécipitation : anti- $\beta$ -caténine**  
**Immunobuvardage anti-SHP-1**



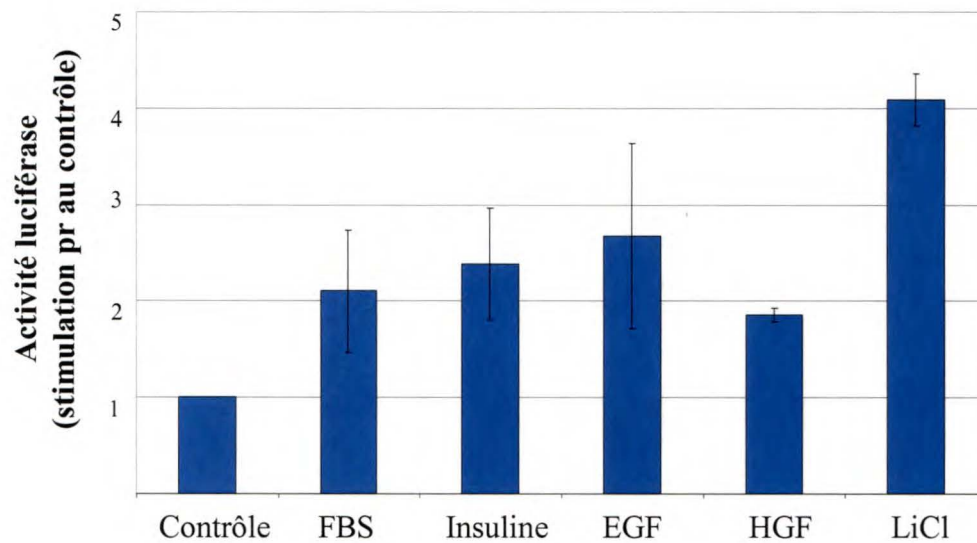
**Figure 10. Déphosphorylation de la  $\beta$ -caténine par SHP-1 dans les cellules HEK 293.**

Les cellules HEK 293 ont été transfectées avec les vecteurs pCMV et pcDNAneo1 seuls (piste 1), avec c-src CA + pcDNAneo1 (piste 2), avec c-src CA + SHP-1WT (piste 3) ou c-src CA + SHP-1C/S (piste 4). 24 heures après la transfection, la  $\beta$ -caténine a été immunoprécipitée à partir de 800  $\mu$ g de protéines. La phosphorylation de la  $\beta$ -caténine immunoprécipitée a été analysée par immunobuvardage en utilisant un anticorps anti-phosphotyrosine (A). Les niveaux de  $\beta$ -caténine (B) et de SHP-1 (C) immunoprécipités ont été déterminés par immunobuvardage. Résultat représentatif de n=3.

## 8. Analyse du rôle de la phosphorylation sur tyrosine de la $\beta$ -caténine

Jusqu'à maintenant, plusieurs évidences tendent à corréler l'augmentation de phosphorylation tyrosine de la  $\beta$ -caténine avec l'invasion tumorale (Muller et al, 1999). Cependant, très peu d'études portent sur l'effet transcriptionnel de la phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine. La phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine semble importante pour son activité transcriptionnelle et étant donné que SHP-1 peut la moduler, nous avons voulu comprendre le rôle de cette phosphorylation sur tyrosine. Nous avons donc tenté l'éclaircir en effectuant des transfections transitoires avec le gène rapporteur TOP-FLASH dans les cellules HIEC sous-confluentes. Nous avons ensuite stimulé ces cellules, privées en sérum durant 36 heures, avec différents facteurs de croissance agissant via des récepteurs à activité tyrosine kinase tels : HGF, insuline, EGF, FBS. Ces facteurs de croissance sont connus pour augmenter la phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine (Monga et al., 2002; Ly et al., 2001). L'activité luciférase a ensuite été dosée. La figure 11 indique que chacun de ces facteurs de croissance parvient à augmenter d'environ 2X les capacités transcriptionnelles de la  $\beta$ -caténine comparativement au contrôle non stimulé. Ces effets sont légèrement plus faibles que ceux obtenus avec un traitement des cellules au LiCl. Ce dernier est un inhibiteur de la GSK3 $\beta$ , donc un activateur de la voie  $\beta$ -caténine/TCF. En présence du LiCl, l'induction du gène rapporteur est de 4X, reflétant l'augmentation de transactivation par le complexe  $\beta$ -caténine/TCF.





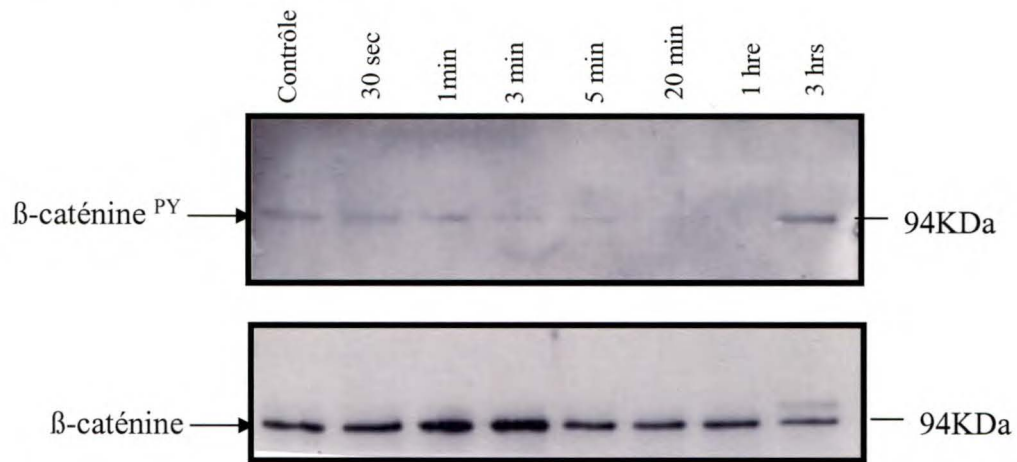
**Figure 11. Augmentation de l'activité transcriptionnelle de  $\beta$ -caténine en réponse aux facteurs de croissance.**

Les cellules HIEC sous confluentes ont été transfetées avec 0.2  $\mu$ g du gène rapporteur TOP-FLASH. 24 heures après la transfection, les cellules ont été privées en sérum durant 36 heures. Elles ont ensuite été stimulées ou non durant 16 heures avec du FBS 5%, EGF 50 ng/mL, Insuline 200 U/ml, HGF 20 ng/ml, LiCl 20 mM. Puis, l'activité luciférase a été mesurée dans ces cellules. Les résultats sont exprimés relativement aux cellules non stimulées dont la valeur a été normalisée à 1. n=3.

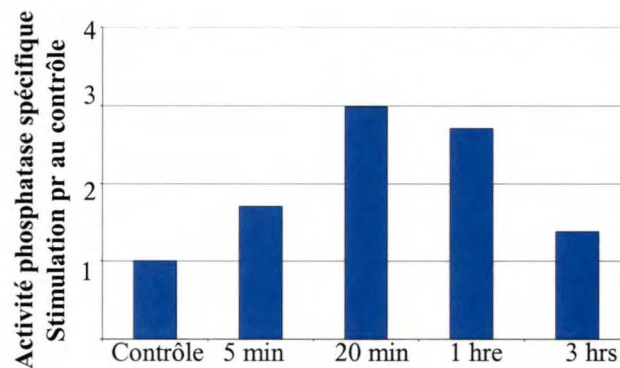
Nous avons ensuite cherché à comprendre si l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine par les facteurs de croissance était exclusivement attribuable à une augmentation de sa phosphorylation sur tyrosine. Des cellules HIEC sous-confluentes, privées en sérum durant 36 hrs, ont ensuite été stimulées ou non durant 30 sec, 1 min, 3 min, 5 min, 20 min, 1 hre, 3 hrs avec 5% de sérum bovin (FBS). La  $\beta$ -caténine a ensuite été immunoprécipitée à partir de 800  $\mu$ g de protéines provenant des lysats. Les niveaux de phosphorylation sur tyrosine ont ensuite été analysés par immunobuvardage. Comme montré à la figure 12A, les cellules non stimulées présentent déjà une phosphorylation sur tyrosine de base. Nous n'avons cependant pas été en mesure de détecter une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine en fonction du temps de stimulation. Cette dernière tend plutôt à diminuer à 20 minutes pour revenir au niveau contrôle après 3 hrs. La figure 12A en bas confirme bien, par immunobuvardage, que les niveaux de  $\beta$ -caténine immunoprécipités sont comparables.

Dans les mêmes échantillons, nous avons parallèlement dosé l'activité de SHP-1. À partir de 800 $\mu$ g de protéine, SHP-1 a été immunoprécipitée et son activité dosée à l'aide d'un phosphopeptide (voir section 7 de matériel et méthodes). L'activité spécifique a ensuite été déterminée en calculant la quantité de phosphates libérés par rapport à la quantité de SHP-1 immunoprécipitée déterminée par densitométrie. De façon intéressante, l'activité de SHP-1 est maximale après 20 min de stimulation avec le sérum (fig. 12B). Cette activité maximale corrèle parfaitement avec la diminution de la phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine (fig. 12A).

**A. Immunoprécipitation  $\beta$ -caténine  
Immunobuvardage anti-PY**



**B. Activité spécifique de SHP-1**

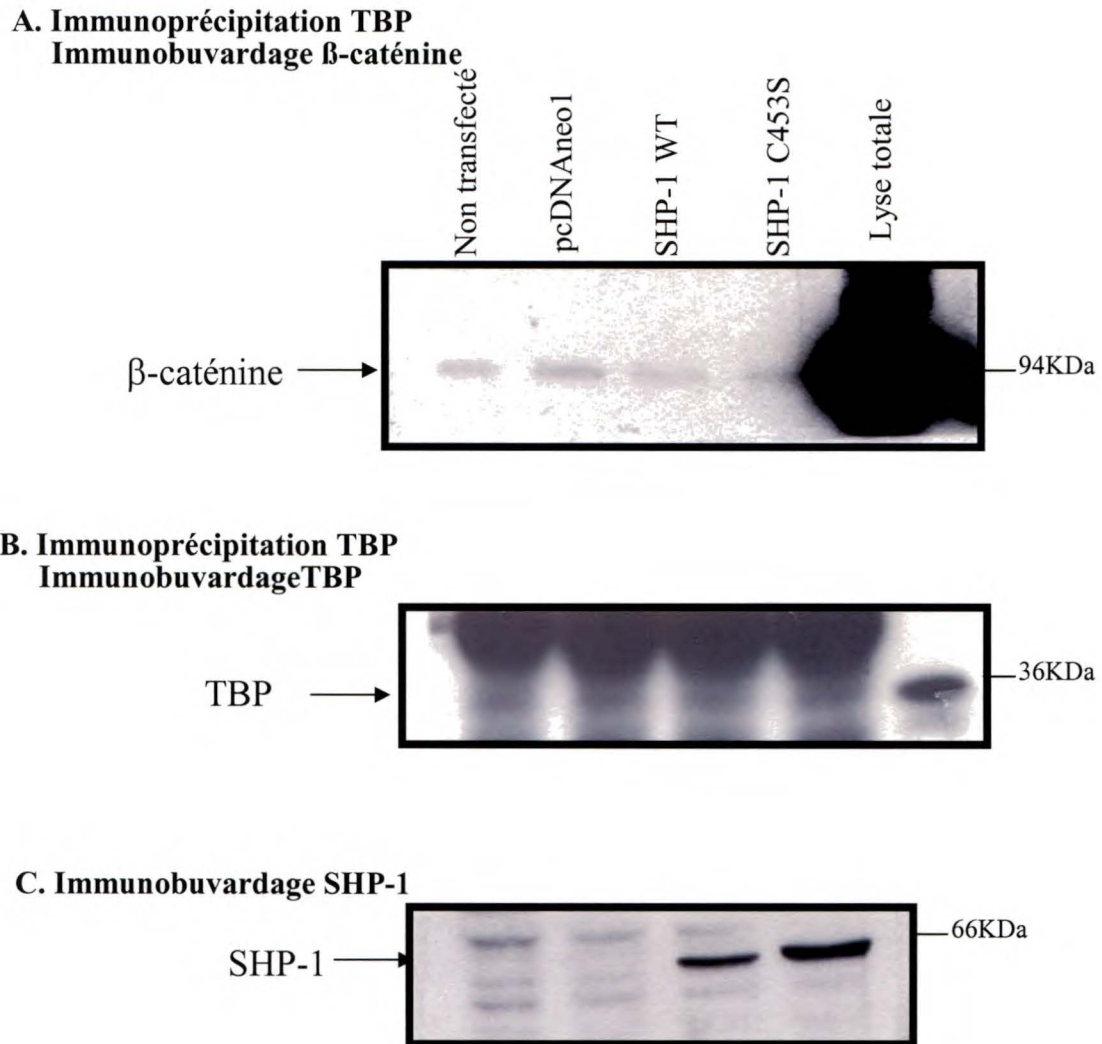


**Figure 12. Phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine dans une cinétique de stimulation au sérum (FBS).**

Les cellules HIEC sous-confluentes ont été privées en sérum durant 36 hrs. Elles ont ensuite été stimulées ou non avec une concentration de 5% sérum durant 30 sec, 1min, 3 min, 5 min, 20 min, 1 hre et 3 hrs. Suite à quoi, elles ont été lysées dans un tampon Triton et la  $\beta$ -caténine a été immunoprécipitée à partir de 800  $\mu$ g de protéines. Un tampon Laemmli 1X a ensuite été ajouté à l'immunocomplexe et les protéines de ce dernier ont été déposées sur gel 10% SDS-PAGE. La détection de la phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine ainsi que les niveaux de  $\beta$ -caténine immunoprécipités ont été détectés par immunobuvardage (A). L'activité spécifique de SHP-1 a également été déterminée à partir d'une immunoprécipitation de 800  $\mu$ g des mêmes lysats. Toutes les activités sont exprimées en pmoles de phosphates libérés / qté de SHP-1 immunoprécipitée déterminée par densitométrie par rapport au contrôle non stimulé normalisé à 1 (B).

## **9. Effet de la surexpression de SHP-1 sur l'association de la $\beta$ -caténine avec la machinerie transcriptionnelle de base**

SHP-1 peut certes déphosphoryler la  $\beta$ -caténine (voir figure 10A), mais quel est l'effet de cette déphosphorylation? En analysant la carte phosphopeptidique de la  $\beta$ -caténine, nous avons identifié 3 tyrosines potentiellement déphosphorylables par SHP-1. Ces 3 tyrosines, Tyr 86, Tyr 604 et Tyr 654 sont situées dans la séquence consensus de déphosphorylation par SHP-1, c'est-à-dire hXY(p)XXh où h = acide aminé hydrophobe et X = acide aminé quelconque (Keilhack et al., 2000). De façon intéressante, Piedra et al. (2001) ont démontré que la phosphorylation la tyrosine 654 était essentielle au recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base au noyau via TBP (TATA binding protein). Étant donnée que la tyrosine 654 était dans la séquence consensus, nous avons entrepris d'analyser si la déphosphorylation amenée par SHP-1 influençait l'interaction entre la  $\beta$ -caténine et TBP. Nous avons donc, dans les cellules HEK293, surexprimé le vecteur vide pcDNAneo1 seul ou contenant SHP-1 sauvage (SHP-1 WT) et le mutant (SHP-1C/S). TBP a ensuite été immunoprécipité à partir de 800  $\mu$ g de lysat cellulaire, puis son interaction avec la  $\beta$ -caténine a été analysée par immunobuvardage. L'immunobuvardage à la figure 13A montre qu'en présence de SHP-1 WT, il y a une diminution de l'association d'environ 30% entre TBP et  $\beta$ -caténine comparativement au contrôle pcDNAneo1. Cette association n'est pas vraiment modifiée en présence du mutant catalytiquement inactif SHP-1 C/S. Les modulations observées ne sont pas le résultat d'une différence dans les niveaux de TBP immunoprécipités comme en témoigne la figure 13B. La figure 13C, quant à elle, confirme bien par immunobuvardage la



**Figure 13. Association entre la  $\beta$ -caténine et TBP dans les cellules HEK293 transfectées avec les constructions de SHP-1.**

SHP-1 sauvage (WT) et SHP-1 C453S (C/S) ainsi que le vecteur vide ont été transfectés dans les cellules HEK293. Deux jours après la transfection, les cellules ont été lysées dans un tampon Triton, puis 800  $\mu$ g de protéines ont été immunoprécipités en présence d'un anticorps anti-TBP. Après leur solubilisation dans un tampon Laemmli 1X, les protéines immunoprécipitées ont été mises sur gel de polyacrylamide 10% SDS-PAGE. La détection des protéines faisant partie de l'immunocomplexe a été effectuée par immunobuvardage en utilisant les anticorps contre  $\beta$ -caténine (A) et TBP (B). 40 $\mu$ g de lysat total a également été mis sur gel pour la vérification de la surexpression de SHP-1 par immunobuvardage (C).

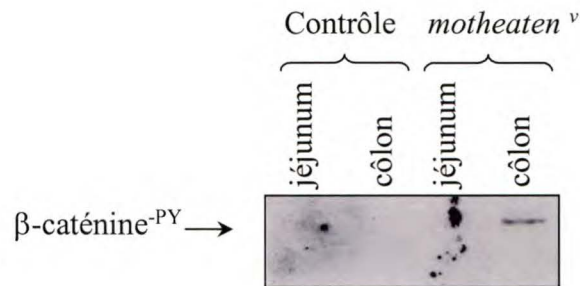
surexpression des constructions de SHP-1 à partir des lysats totaux. La surexpression de SHP-1 WT entraîne donc une diminution de l'association entre TBP et la  $\beta$ -caténine.

#### **10. Analyse du statut de la voie $\beta$ -caténine/TCF dans les souris *motheaten*<sup>v</sup>**

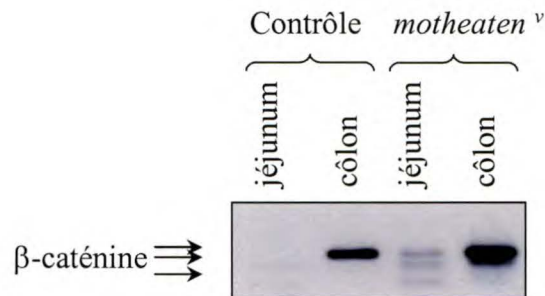
Comme nous avons montré *in vitro* que la  $\beta$ -caténine pouvait être un substrat pour SHP-1, nous nous sommes proposés de vérifier le niveau de phosphorylation sur tyrosine dans le côlon et le jéjunum des souris *motheaten*<sup>v</sup>. Rappelons que les souris *motheaten*<sup>v</sup> sont des souris qui ne possèdent que 20% d'activité résiduelle SHP-1. On peut donc s'attendre à ce que les substrats de SHP-1, dans ces souris, soient plus fortement phosphorylés sur tyrosine. Nous avons donc sacrifié des souris contrôle et *motheaten*<sup>v</sup>, puis le jéjunum et le côlon ont été extraits puis homogénisés. Les lysats cellulaires résultant ont été incubés en présence d'un anticorps anti- $\beta$ -caténine en vue d'une immunoprécipitation. Les niveaux de phosphorylation sur tyrosine ont ensuite été déterminés par immunobuvardage. Le côlon des souris *motheaten*<sup>v</sup> présente en effet, une  $\beta$ -caténine plus fortement phosphorylée sur tyrosine comparativement au contrôle (fig. 14A), bien qu'une quantité légèrement plus grande de  $\beta$ -caténine ait été immunoprécipitée dans ce segment (fig. 14B). On peut également voir à la figure 14B une différence dans le profil d'expression de la  $\beta$ -caténine selon qu'elle soit issue du côlon (1 bande majoritaire) ou du jéjunum (3 bandes), laissant suggérer des différences dans les niveaux d'expression et de phosphorylation globaux. Les niveaux de phosphorylation sur tyrosine sur  $\beta$ -caténine, plus élevés dans les souris *motheaten*<sup>v</sup>, confirment que cette dernière est bien un substrat de SHP-1.



**A. Immunoprécipitation anti- $\beta$ -caténine**  
**Immunobuvardage anti-phosphotyrosine (PY)**



**B. Immunoprécipitation anti- $\beta$ -caténine**  
**Immunobuvardage anti- $\beta$ -caténine**



**Figure 14. Niveau de phosphorylation de la  $\beta$ -caténine dans les souris *motheaten*<sup>v</sup> .**

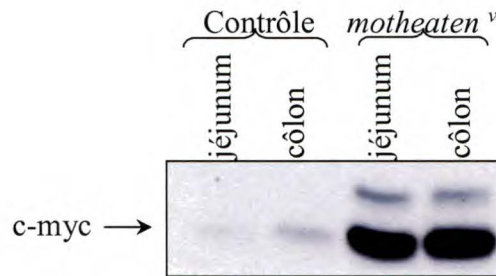
Les souris contrôles de type sauvage et *motheaten*<sup>v</sup> ont été sacrifiées 4 semaines après la naissance. Le jéjunum et le côlon ont été extraits et la muqueuse intestinale a été isolée et homogénisée dans un tampon Triton. À partir de 800  $\mu$ g de protéines, la  $\beta$ -caténine a été immunoprécipitée dans chacun des homogénats d'intestin. Les protéines immunoprécipitées ont ensuite été solubilisées dans un tampon Laemmli et séparées par SDS-PAGE 10%. Les niveaux de phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine (**A**) ainsi que la quantité de  $\beta$ -caténine immunoprécipitée (**B**) ont été analysés par immunobuvardage avec les anticorps antiphosphotyrosine et  $\beta$ -caténine respectivement.

Les résultats, jusqu'à maintenant, semblent suggérer que SHP-1 peut contrôler les capacités transcriptionnelles de la  $\beta$ -caténine par déphosphorylation sur tyrosine. L'expression de certains gènes cibles de la voie  $\beta$ -caténine/TCF a, pour cette raison, été investiguée dans le côlon et le jéjunum des souris *motheaten*<sup>v</sup>. L'expression de c-myc (fig. 15A) et de la cycline D1 (fig. 15B), deux protéines induites par la voie, a donc été analysée par immunobuvardage à partir de lysats de côlon et de jéjunum des différentes souris. Les niveaux de protéines déposés sur gel ont également été analysés avec un immunobuvardage actine (fig. 14C). On peut remarquer une forte augmentation de l'expression de ces 2 protéines dans les souris *motheaten*<sup>v</sup> comparativement aux souris contrôles. Ce phénomène est particulièrement accentué pour c-myc. Les résultats semblent donc montrer une corrélation entre les niveaux de phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine et l'augmentation de ses capacités transcriptionnelles, du moins dans le côlon.

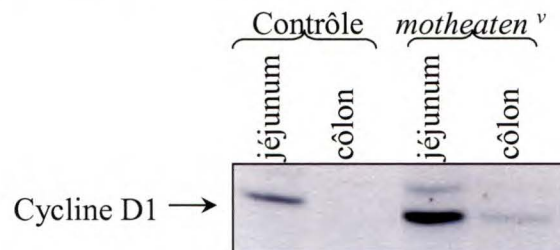
Une augmentation de l'oncogène c-myc et de la cycline D1 est souvent associée à une plus forte prolifération cellulaire et à la progression tumorale (Glockner et al., 2002). Nous avons voulu vérifier, si dans les souris *me*<sup>v</sup>, l'augmentation d'expression de ces protéines résultait en une augmentation globale de la prolifération dans l'intestin. Un analogue de la thymidine tritiée, le BrDu, a été injecté 2 hrs avant le sacrifice des souris contrôle et *me*<sup>v</sup>. Ce composé, marque spécifiquement les cellules en phase S puisqu'il s'incorpore dans l'ADN nouvellement synthétisé. Les souris ont ensuite été sacrifiées et les segments intestinaux, extraits et préparés pour une immunofluorescence directe. De façon générale, la figure 16A et B montre qu'il n'y a pas vraiment de



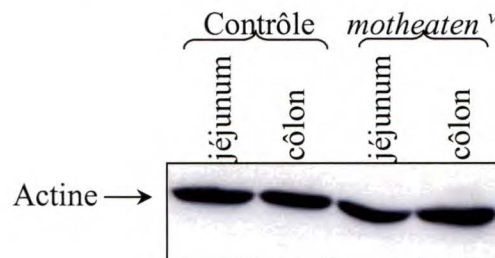
### A. Immunobuvardage c-myc



### B. Immunobuvardage cycline D1



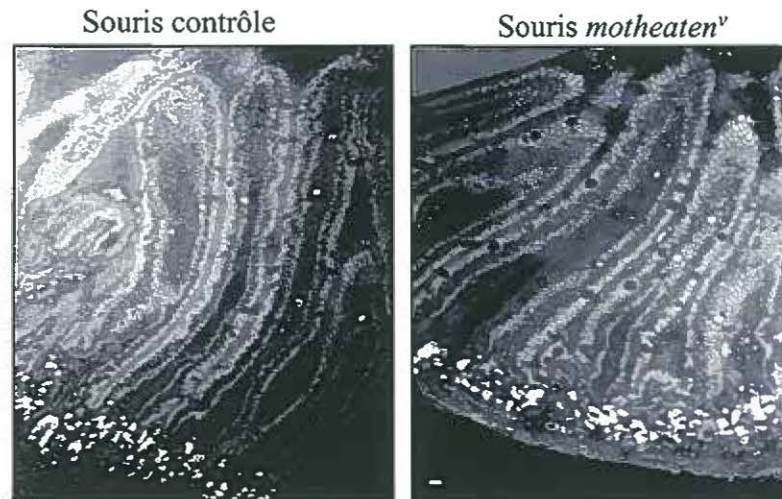
### C. Immunobuvardage actine



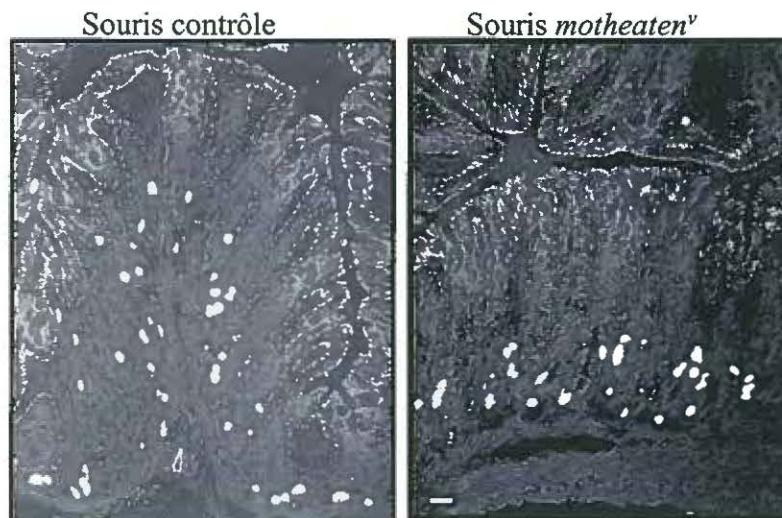
**Figure 15. Expression de certains gènes de la voie  $\beta$ -caténine/TCF dans les souris *motheaten*<sup>v</sup>.**

Les souris de type sauvage (contrôle) et *motheaten*<sup>v</sup> ont été sacrifiées 4 semaines après la naissance. Le jéjunum et le côlon ont été extraits et la muqueuse intestinale a été isolée et homogénisée dans un tampon Laemmli. 40  $\mu$ g de protéines ont été séparés sur un gel 10% SDS-PAGE. L'expression de c-myc (**A**), de la cycline D1 (**B**) et de l'actine (**C**) a été analysée par immunobuvardage dans chacune des sections d'intestin.

## A. Jéjunum



## B. Côlon



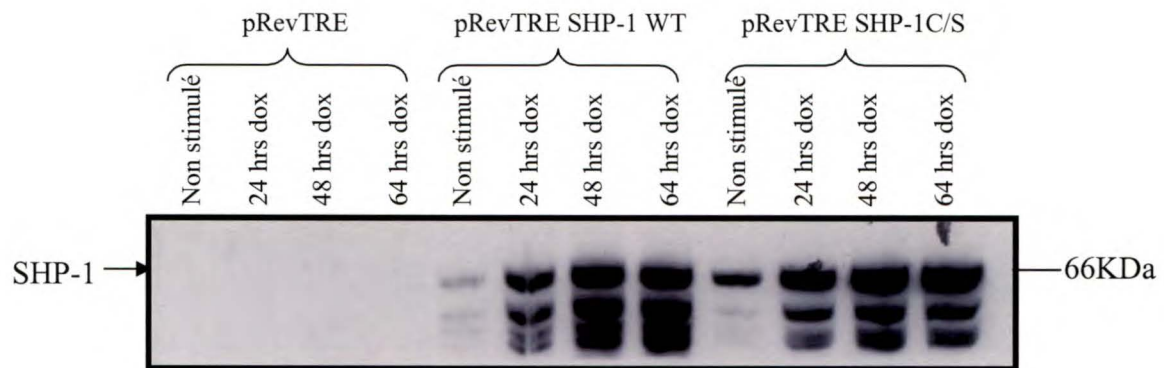
**Figure 16. Mesure de la synthèse d'ADN dans les souris *motheaten*<sup>v</sup> .**

Les souris type sauvage (contrôle) et les souris *motheaten*<sup>v</sup> âgées de 4 semaines ont été injectées par voie intrapéritonéale avec une solution de BrDu (10 mM) à raison de 1 ml/g de poids corporel durant 2 heures. Elles ont ensuite été sacrifiées, puis le jéjunum (A) et le côlon (B) ont été extraits et préparés en vue d'une immunofluorescence directe avec un anticorps anti-BrDu (1/15). Résultat représentatif n=3. Barre=20µm.

différence dans la prolifération cellulaire autant au niveau du jéjunum que du côlon dans les 2 types de souris. Donc l'augmentation de la cycline D1 et de c-myc dans les souris *me<sup>v</sup>* n'est pas suffisante pour induire une hyperprolifération des cellules intestinales épithéliales.

## **11. Analyse de l'expression de la cycline D1 dans les populations inductibles SHP-1**

Afin d'approfondir le rôle de SHP-1 dans les cellules épithéliales intestinales, nous avons mis au point une population stable de cellules HIEC capables de surexprimer SHP-1 sauvage et SHP-1 C/S de façon inductible. Avant d'entreprendre une multitude d'expérimentations, nous avons d'abord vérifié l'inductibilité de la protéine dans les cellules infectées et sélectionnées. Les cellules HIEC infectées avec pRevTRE contenant ou non SHP-1 WT ou SHP-1C/S ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits à densité égale. Le lendemain, elles ont été traitées avec l'agent inducteur, la doxycycline à raison de 5 µg/ml durant 24, 48 et 64 hrs. Les cellules lysées ont ensuite été soumises à un immunobuvardage pour la détection de SHP-1. La figure 17A montre bien l'induction d'expression de SHP-1 WT et SHP-1C/S après seulement 24 hrs de stimulation avec l'agent inducteur. L'expression se maintient même après 48 et 64 hrs de stimulation. Aucune modulation de l'expression de la protéine n'est observée dans les cellules pRevTRE traitées avec la doxycycline. On peut également noter que, dans le cas des cellules pRevTRE SHP-1 WT et pRevTRE SHP-1C/S non stimulées avec la doxycycline, il y a quand même une expression de base de la protéine. En effet, ce type d'approche pour exprimer des protéines de façon inductible peut parfois permettre



**Figure 17. Inductibilité de l'expression de SHP-1 dans les populations HIEC.**

Les cellules HIEC TetOn infectées avec le vecteur inductible pRevTRE vide ou contenant SHP-1 sauvage (SHP-1WT) ou SHP-1C453S (SHP-1 C/S) ont été ensemenc es dans des plaques de 6 puits. Elles ont par la suite été trait es ou non durant 24 hrs, 48 hrs, 64 hrs avec la doxycycline (Dox) 5  $\mu$ g/ml, l'agent inducteur. Les cellules ont ensuite été lys es dans un tampon Laemmli et 40  $\mu$ g de protéines ont été déposés sur gel SDS-PAGE 10% pour vérifier l'expression de SHP-1 par immunobuvardage.

l'expression de la protéine, même en absence d'agent inducteur. L'expression de SHP-1 WT et SHP-1 C/S peut donc être fortement augmentée par l'utilisation de promoteurs inductibles en présence de doxycycline.

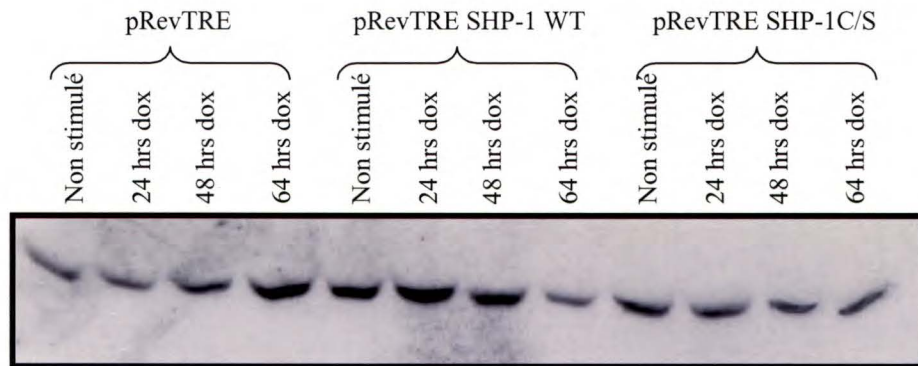
Nous nous sommes ensuite intéressés à voir quel était l'effet d'une surexpression des différentes constructions de SHP-1 sur l'expression de certaines protéines du cycle cellulaire. Comme nous avons montré par transfection transitoire que SHP-1 diminuait d'environ 50% l'activité du gène rapporteur *cycline D1*-luciférase, nous avons tenté de voir son effet sur l'expression de la protéine dans les populations inductibles. Dans les mêmes échantillons décrits au paragraphe précédent, nous avons analysé par immunobuvardage, l'expression de la cycline D1. La figure 18A montre bien que dans les cellules surexprimant SHP-1 WT depuis 64 hrs, il y a une diminution de 50% de l'expression de la cycline D1 par rapport aux cellules non stimulées. Cet effet n'est cependant pas observé dans les cellules pRevTRE et pRevTRE SHP-1 C/S en présence de doxycycline. Un immunobuvardage avec l'actine confirme bien la quantité égale de protéines déposées sur gel (fig. 18B).

## **12. Identification d'un nouveau partenaire de SHP-1 par double-hybride**

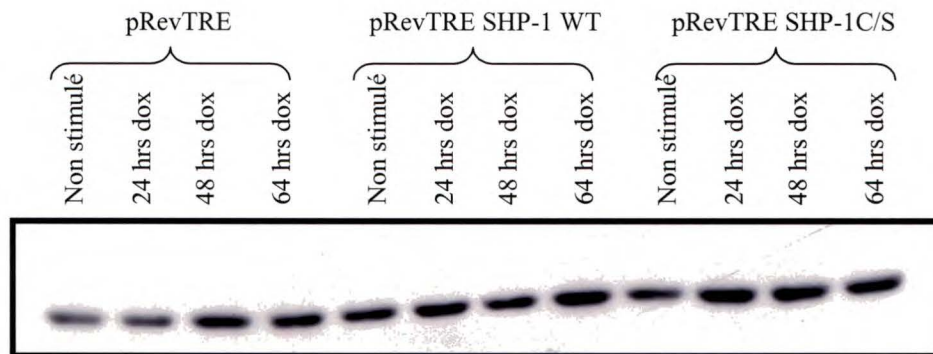
Les partenaires de SHP-1 sont bien connus dans les cellules hématopoïétiques alors que peu de choses sont connues sur ses partenaires épithéliaux. La seconde partie de mon projet était donc d'identifier de nouveaux partenaires de SHP-1 dans les cellules épithéliales intestinales. Nous avons donc procédé à un double hybride à partir d'une



## A. Immunobuvardage cycline D1



## B. Immunobuvardage actine



**Figure 18. Effet de l'induction de SHP-1 sur l'expression de la cycline D1.**

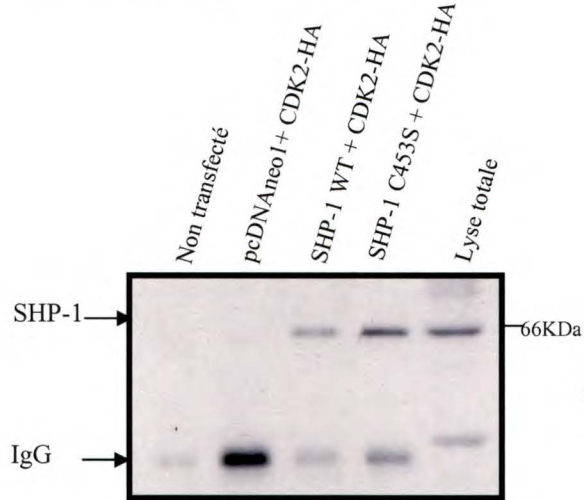
Les cellules HIEC TetON infectées avec le vecteur inducible pRevTRE vide ou contenant SHP-1 sauvage (SHP-1WT) ou SHP-1C453S (SHP-1 C/S) ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits. Elles ont par la suite été traitées ou non durant 24 hrs, 48 hrs, 64 hrs avec la doxycycline (Dox) 5 µg/ml, l'agent inducteur. Les cellules ont ensuite été lysées dans un tampon Laemmli et 40 µg de protéines ont été déposés sur gel SDS-PAGE 10% pour vérifier l'expression de la cycline D1 (A) et de l'actine (B) par immunobuvardage.

librairie de cellules Caco-2/15 confluentes depuis 6 jours en utilisant SHP-1 comme appât. À partir de l'isolement de l'ADN de 12 clones de levures par sélection nutritionnelle, nous sommes parvenus à l'identification de 2 protéines interagissant potentiellement avec SHP-1. Une de ces protéines, identifiée par séquençage comme étant BC016354, est une protéine nouvellement clonée dont les fonctions ne sont pas encore déterminées. Nous avons donc concentré nos efforts sur l'autre protéine identifiée. De façon intéressante, cette 2<sup>ème</sup> protéine s'est avérée être CDK2, la sous-unité catalytique des complexes cycline E/ CDK2 et cycline A/ CDK2.

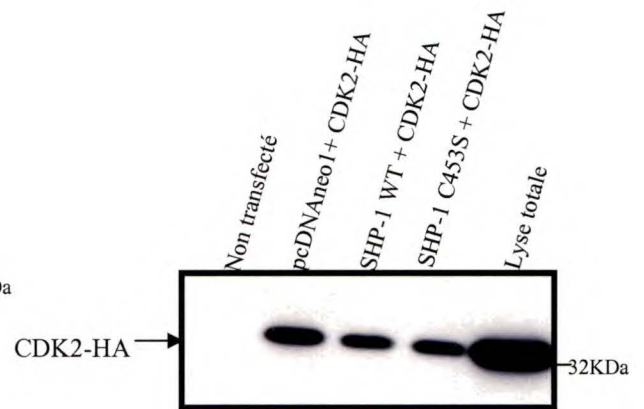
### **13. Interaction entre SHP-1 et CDK2 dans les cellules épithéliales intestinales**

Une des premières étapes suivant ceci a donc été de confirmer l'interaction entre ces protéines dans les modèles *in vitro*. Après la surexpression de CDK2 étiqueté HA en combinaison avec pcDNAneo1 contenant ou non SHP-1 sauvage (SHP-1WT) et SHP-1 mutant (SHP-1 C/S) dans les cellules HEK293, nous avons immunoprécipité CDK2-HA avec l'anticorps anti-HA. Nous avons ensuite déterminé la présence de SHP-1 dans l'immunocomplexe par immunobuvardage. On peut voir une forte association de SHP-1 WT et SHP-1C/S avec CDK2-HA dans les cellules surexprimant ces constructions (fig.19A) comparativement aux cellules transfectées ou non avec le vecteur vide. L'association plus forte dans les cellules surexprimant à la fois SHP-1C/S et CDK2-HA rappelle certaines observations voulant que les tyrosine phosphatases inactives séquestrent leur substrat (Flint et al, 1997). Les immunobuvardages HA et SHP-1 (fig 19 B et C) confirment la surexpression des protéines alors que la figure 19B indique en

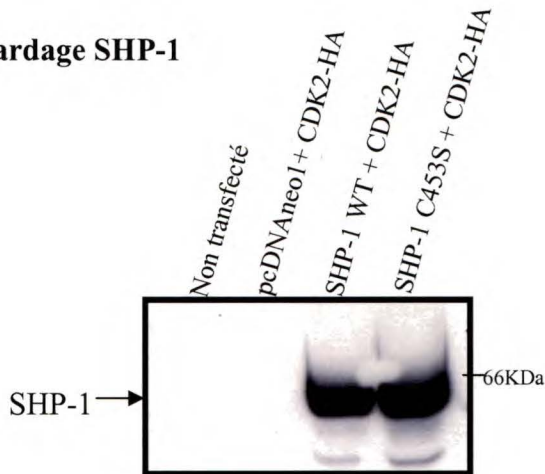
**A. Immunoprécipitation HA  
Immunobuvardage SHP-1**



**B. Immunoprécipitation HA  
Immunobuvardage HA**



**C. Immunobuvardage SHP-1**



**Figure 19. Association entre SHP-1 et CDK2 surexprimés dans les cellules HEK293.**

Le vecteur vide pcDNAneo1 ou contenant les inserts codant pour SHP-1 sauvage (WT) et SHP-1 C453S (C/S) ont été cotransfectés avec une construction CDK2 étiquetée HA dans les cellules HEK293. 48 hrs après la transfection, CDK2-HA a été immunoprécipité à partir de 500 µg de protéines en utilisant un anticorps anti-HA. Un tampon Laemmli a ensuite été ajouté aux immunocomplexes avant leur séparation sur gel 10% SDS-PAGE. La détection de SHP-1 (A) et de CDK2-HA (B) dans les immunocomplexes ainsi que dans une lyse totale surexprimant CDK2-HA seul a été effectuée par immunobuvardage avec les anticorps correspondants. 40 µg de chacun des lysats totaux ont été déposés sur gel afin de vérifier, par immunobuvardage avec un anticorps SHP-1, la surexpression de la protéine (C).

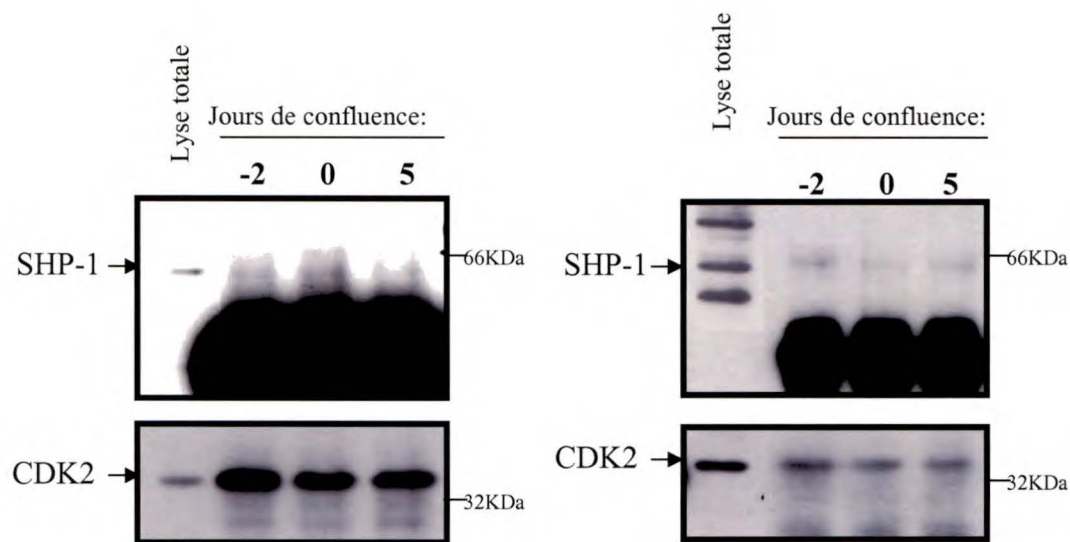


plus, un taux d'immunoprécipitation identique de CDK2-HA. On peut donc penser que CDK2 interagit avec SHP-1.

Comme nous avons démontré une association entre les 2 protéines en condition de surexpression, nous devions confirmer si l'interaction endogène existait. À partir de lysats de cellules Caco-2/15 et HIEC à différents stades de confluence jr-2, jr 0 et jr 5, nous avons immunoprécipité CDK2 endogène. La détection de SHP-1 dans l'immunoprécipité par immunobuvardage a ensuite été réalisée. Les figures 20A et B montrent bien la présence par immunobuvardage de SHP-1 dans l'immunoprécipité CDK2 dans les 2 modèles cellulaires à sous confluence comme à confluence. L'association semble toutefois être légèrement diminuée lorsque les cellules atteignent la confluence (jr 0 et jr 5), même si le taux de CDK2 immunoprécipité est équivalent (fig.20 A et B, bas).

#### **14. Phosphorylation de SHP-1 par CDK2**

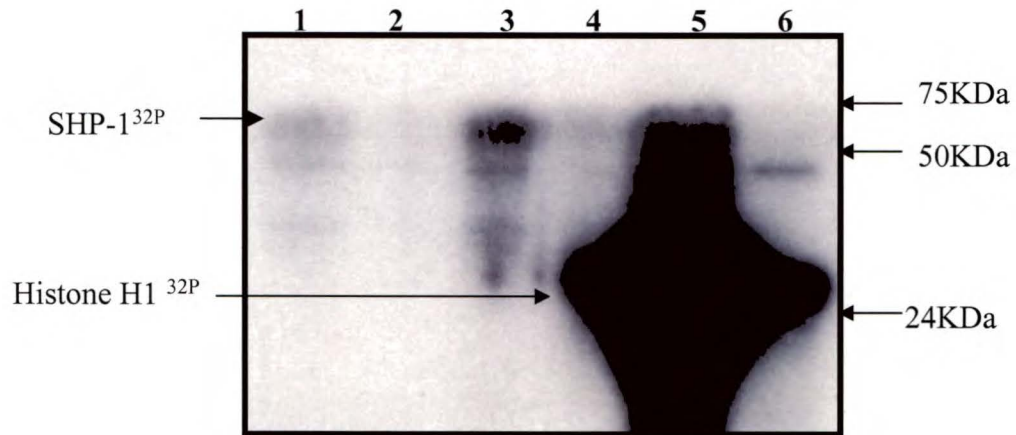
Nous nous sommes ensuite penchés sur le rôle fonctionnel de l'association entre ces 2 protéines. Comme CDK2 est une Ser/Thr kinase possédant de nombreux substrats, nous avons d'abord postulé qu'elle pouvait mener à la phosphorylation de SHP-1 et possiblement influencer son activité. Nous avons vérifié si SHP-1 comportait dans sa séquence, des sites consensus de phosphorylation par CDK2 (S/T-P-X-K/R où S/T=Ser/Thr P= Pro et K/R=Arg/Asp et X=acide aminé quelconque) (Kitagawa et al., 1996). Il existe en effet 1 site correspondant à cette séquence. Nous avons alors un essai

**A. Caco-2/15****Immunoprécipitation CDK2****Immunobuvardage SHP-1 et CDK2****B. HIEC****Immunoprécipitation CDK2****Immunobuvardage SHP-1 et CDK2**

**Figure 20. Association entre SHP-1 et CDK2 endogène dans les cellules épithéliales intestinales.**

Les cellules Caco-2/15 (A) et HIEC (B), portées à 70% (jr-2) et 100% (jr 0, jr 5) de confluence ont été lysées dans un tampon Triton. CDK2 a ensuite été immunoprécipité à partir de ces lysats cellulaires. Les protéines immunoprécipitées ont ensuite été solubilisées dans un tampon Laemmli et séparées par SDS-PAGE 10%. Les quantités de CDK2 et de SHP-1 immunoprécipitées ont été analysées par immunobuvardage avec les anticorps respectifs. 40µg de protéines d'une lyse totale (jr-2) de chacun des types cellulaires ont également été déposés sur gel pour la détection des protéines CDK2 et SHP-1. Résultat n=2.

kinase en utilisant le complexe recombinant actif cycline E/CDK2 pour voir s'il parvenait à phosphoryler SHP-1. Nous avons immunoprécipité SHP-1 à partir de cellules HEK293 surexprimant SHP-1 sauvage (SHP-1WT) et SHP-1 inactif (SHP-1C/S), puis nous avons placé cet immunoprécipité en présence d'ATP radioactif et de la protéine recombinante. Afin de s'assurer de la spécificité de la phosphorylation amenée par CDK2, nous avons inclus des conditions en présence de l'inhibiteur de CDK2, la roscovitine. La figure 21 (piste 1 et 3) montre qu'une protéine, ayant un poids de 66kDa correspondant à SHP-1 est efficacement phosphorylée par le complexe cycline E/CDK2. Cette phosphorylation est complètement abolie en présence de l'inhibiteur de CDK2 (piste 2 et 4). On note également que CDK2 semble phosphoryler plus fortement SHP-1 C/S, probablement dû à la plus forte association entre les protéines. Des contrôles positifs avec l'histone H1, un substrat connu de CDK2, ont également été inclus pour vérifier l'efficacité de la réaction kinasique (pistes 5-6). Donc, en plus de s'associer avec SHP-1, CDK2 semble avoir la capacité de phosphoryler la phosphatase.



- 1: Immunoprécipité SHP-1WT + cycline E/CDK2 recombinant
- 2: Immunoprécipité SHP-1WT + cycline E/CDK2 recombinant + roscovitine 50 $\mu$ M
- 3: Immunoprécipité SHP-1C453S + cycline E/CDK2 recombinant
- 4: Immunoprécipité SHP-1C453S + cycline E/CDK2 recombinant + roscovitine 50 $\mu$ M
- 5: Histone H1 5 $\mu$ g+ cycline E/CDK2 recombinant
- 6: Histone H1 5 $\mu$ g+ cycline E/CDK2 recombinant + roscovitine 50 $\mu$ M

**Figure 21. Phosphorylation spécifique de SHP-1 par CDK2 dans les cellules HEK293.**

SHP-1WT et SHP-1 C453S ont été transfectés dans les cellules HEK293. 48 hrs après la transfection, les cellules ont été lysées et SHP-1 a été immunoprécipitée à partir 800  $\mu$ g de protéines. Les immunocomplexes ont ensuite utilisés comme substrats kinasiques pour 40 ng de protéine recombinante cyclineE/CDK2 active en absence (1 et 3) ou en présence de l'inhibiteur de CDK2 roscovitine 50  $\mu$ M (2 et 4). En contrôle positif, l'histone H1, a été ajoutée à la protéine recombinante en absence (5) ou en présence (6) de l'inhibiteur de CDK2. Le tout a été mis dans un tampon d'essai kinase en présence d'ATP marqué au  $^{32}$ P. Après la réaction, un tampon Laemmli a été ajouté à chacun des échantillons, puis ces derniers ont été déposés sur gel SDS-PAGE 12.5%. La détection de la radioactivité incorporée a été effectuée par autoradiographie. Résultat n=1

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

#### **1. Implication de SHP-1 dans l'arrêt de prolifération des cellules épithéliales intestinales.**

Dans la première partie du travail, nous avons tenté de localiser la protéine SHP-1 dans nos modèles cellulaires. D'abord, dans l'intestin foetal humain, une localisation nucléaire de SHP-1 dans toutes les cellules du côlon et du jéjunum a été établie (fig. 1A et B). Le marquage plus fort de la protéine dans le tiers inférieur de la villosité et dans la moitié de la crypte de côlon nous a particulièrement intéressés, puisqu'il s'agit de zones où les cellules ont cessé toute prolifération. La localisation préférentiellement nucléaire de SHP-1 dans tous les modèles cellulaires, à différents stades de confluence, a également été observée (fig. 2A, B et C). De plus, l'expression et surtout l'activité de SHP-1 sont augmentées à l'atteinte de la confluence dans les cellules HIEC et Caco-2/15 (fig. 3 et 4). De façon plus intéressante, dans les cellules Caco-2/15, ces inductions d'expression et d'activité sont parfaitement corrélées avec l'arrêt de prolifération précédant l'induction de la différenciation. Ceci a été visualisé par l'hypophosphorylation de pRb et l'induction de la sucrase-isomaltase (fig. 3C et 4C).

Ensemble, tous ces résultats tendent à suggérer l'implication de SHP-1 dans la régulation négative du cycle cellulaire des cellules intestinales. En effet, SHP-1 est connue pour mener à la terminaison de plusieurs voies de signalisation dans les cellules

hématopoïétiques (Zhang, 2000). Généralement cytoplasmique dans ces cellules, un isoforme de SHP-1, seulement exprimé dans le noyau des cellules non-hématopoïétiques, a dernièrement été identifié (Craggs et Kelli, 2001). Comme SHP-1 est spécifiquement localisée dans les noyaux des cellules intestinales à l'étude, ceci laisse donc entrevoir des nouveaux rôles nucléaires pour la protéine. L'augmentation de son expression et de son activité, à l'atteinte de la confluence et début de la différenciation dans les cellules Caco-2/15 est particulièrement révélateur sur son rôle potentiellement négatif dans la prolifération. Ceci rappelle une étude similaire réalisée dans les cellules myéloïdes où une augmentation de l'activité et de l'expression avait été notée durant la différenciation (Uesugi et al., 1999). Ceci renforce l'hypothèse selon laquelle l'action de SHP-1 pourrait promouvoir l'arrêt de prolifération nécessaire à tout processus de différenciation. Cependant, comme SHP-1 est particulièrement active dans les cellules Caco-2/15 différenciées, on peut penser qu'elle joue également un rôle important dans la différenciation entérocytaire. Nous nous sommes toutefois surtout concentrés sur son rôle potentiellement inhibiteur sur la prolifération des cellules épithéliales intestinales.

Par des études de transfections transitoires, il a été noté que la surexpression de SHP-1 dans les cellules intestinales HIEC provoquait une diminution de l'expression de la dhfr, de la cycline D1 et de c-myc. De plus, la surexpression ectopique de SHP-1 mène à la diminution de l'activité de la voie  $\beta$ -caténine/TCF comme démontré par TOP-FLASH sans toutefois influencer l'expression de c-fos (fig. 5 et 6). Nous proposons ici,

pour la première fois, que SHP-1, médie son effet antiprolifératif dans les cellules intestinales via le contrôle négatif de la voie  $\beta$ -caténine/TCF.

En contrôlant négativement l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine, SHP-1 parvient à inhiber, dans les cellules HIEC prolifératives, les cibles de la voie  $\beta$ -caténine/TCF tels cycline D1 et c-myc. L'expression de ces gènes représente l'un des événements les plus précoces menant à la transition G1/S. Elle peut être augmentée par plusieurs voies de signalisation, notamment par la voie des MAPKs p42/p44 (Lavoie et al., 1996). Cependant, nous avons clairement démontré que la surexpression de SHP-1WT n'avait aucune incidence sur l'expression de c-fos, un gène contrôlé par les MAPKs (fig. 5D) (Terasawa et al 2003). Ceci exclut donc la possibilité que SHP-1 puisse affecter la voie des MAPKs, confirmant par la même occasion, la spécificité de SHP-1 envers la voie  $\beta$ -caténine/TCF. L'importance de cette voie dans le maintien du compartiment prolifératif de la crypte intestinale n'est plus à démontrer (van de Wetering et al., 2002). Son activité constitutive dans les cancers colorectaux contribue à la prolifération incontrôlée (Kinzler et Vogelstein, 1996). Parallèlement, il a été démontré que l'inhibition de cette voie est essentielle à l'induction de la différenciation des cellules intestinales Caco-2 (Mariadason et al., 2001). Par conséquent, le fait que SHP-1 puisse contrôler négativement cette voie de signalisation dans les cellules intestinales, contribuerait à l'arrêt de prolifération tout en permettant leur différenciation. Ceci est en accord avec la plus forte expression de SHP-1 dans le tiers inférieur de la villosité et milieu de la crypte colonique, des zones où les cellules épithéliales ont cessé leur

prolifération et sont différenciées (fig. 1A et B). Donc, SHP-1 contrôlerait la prolifération des cellules épithéliales intestinales via l'inhibition de la voie  $\beta$ -caténine/TCF.

Afin de démontrer comment SHP-1 contrôlerait la voie  $\beta$ -caténine/TCF, nous avons d'abord vérifié par immunoprécipitation, dans les modèles cellulaires HIEC et IEC-6, l'interaction entre les deux protéines. Nous avons noté une forte interaction entre ces dernières à sous confluence et une diminution de cette interaction après la confluence (fig. 7A). L'explication de cette perte d'interaction réside fort probablement dans la relocalisation de la  $\beta$ -caténine aux contacts cellules-cellules comme démontré par l'immunofluorescence (fig. 8). La  $\beta$ -caténine participe, avec la E-cadhérine, à la formation des jonctions adhérentes. Il est également connu qu'une surexpression de E-cadhérine provoque la séquestration de la  $\beta$ -caténine aux contacts cellules-cellules limitant ainsi sa disponibilité à induire la voie  $\beta$ -caténine/TCF (Sasaki et al., 2000). La localisation cellulaire nucléaire simultanée des 2 protéines à sous-confluence renforce l'hypothèse selon laquelle SHP-1 contrôle négativement l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine au moment où elle se retrouve au noyau.

## **2. Mécanismes d'action de SHP-1 dans l'arrêt de prolifération des cellules intestinales.**

Dans notre lancée, nous avons cherché à comprendre le mécanisme d'action de SHP-1 dans l'arrêt de prolifération. Notre première hypothèse était que SHP-1 puisse interférer avec la capacité de liaison à l'ADN du complexe  $\beta$ -caténine/TCF. En effet, il avait été



rapporté que la liaison de ce complexe diminuait lors de l'atteinte de la confluence et lors de la différenciation des cellules Caco-2 (Mariadason et al., 2001). L'augmentation de l'expression de SHP-1 observée dans nos expériences sur les Caco-2/15 corrèlerait probablement avec cette baisse de liaison à l'ADN du complexe  $\beta$ -caténine/TCF. Effectivement, nous avons observé que la diminution de liaison du complexe coïncidait parfaitement avec l'induction d'expression et d'activité de SHP-1 dans ces cellules (fig. 9A). Alors la possibilité que SHP-1 contrôlerait l'activité du complexe  $\beta$ -caténine/TCF en interférant avec sa liaison à l'ADN s'est avérée alléchante. Cependant, des études de surexpression de SHP-1 dans les cellules HEK293 ont indiqué que SHP-1 n'influçait aucunement cette liaison (fig. 9B). Pourtant, il est rapporté dans la littérature que SHP-1 peut inhiber la liaison à l'ADN du facteur de transcription HOXA10 dans les cellules myéloïdes (Elkund et al., 2002). Dans le cas des cellules épithéliales intestinales, SHP-1 n'influçait pas cette liaison.

Nous avons par la suite tenté d'identifier comment SHP-1 pouvait inhiber l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine. Plusieurs évidences suggèrent que la  $\beta$ -caténine peut être phosphorylée sur tyrosine (Muller et al. 1999). Nous avons donc proposé que SHP-1, en déphosphorylant la  $\beta$ -caténine sur tyrosine, pouvait parvenir à diminuer ses capacités transcriptionnelles. Jusqu'à maintenant, seuls les facteurs de transcription STAT sont surtout connus pour subir une modification de leur activité transcriptionnelle par phosphorylation sur tyrosine (Levy et Darnell, 2002). Nous avons donc entrepris de vérifier si la  $\beta$ -caténine pouvait être un substrat pour SHP-1 et non pas seulement un partenaire d'interaction. Avec une expérience de transfection transitoire dans les cellules

HEK293, nous avons démontré que SHP-1 pouvait renverser la phosphorylation sur tyrosine amenée par c-src, une tyrosine kinase connue pour phosphoryler la  $\beta$ -caténine (fig. 10A). Donc, SHP-1 peut déphosphoryler efficacement la  $\beta$ -caténine sur tyrosine, ce qui en fait un nouveau substrat dans les cellules épithéliales intestinales. La co-expression du mutant inactif SHP-1 C/S ne parvient pas à déphosphoryler la  $\beta$ -caténine sur tyrosine, confirmant que la déphosphorylation amenée est vraiment spécifique à SHP-1. De plus, la plus forte association entre SHP-1 C/S et la  $\beta$ -caténine appuie l'identification de la  $\beta$ -caténine comme nouveau substrat (fig. 10B). Rappelons que les tyrosine phosphatases inactives demeurent associées à leurs substrats (Flint et al, 1997). La diminution de la phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine amenée par SHP-1 pourrait donc permettre d'expliquer la baisse de son activité transcriptionnelle visualisée par TOP-FLASH (fig.6A).

Qu'est-il connu sur l'impact de la phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine? En effet, plusieurs récepteurs à facteurs de croissance ainsi que des kinases de type src augmentent la phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine au niveau cytoplasmique. Il n'est pas rare non plus d'observer une hyperphosphorylation sur tyrosine de cette protéine lors du développement de cancers et lors de l'invasion tumorale (Daniel et Reynolds, 1997). Cette augmentation de phosphorylation semble permettre la dissociation de la  $\beta$ -caténine des jonctions adhérentes conduisant à son accumulation cytoplasmique et éventuellement sa translocation nucléaire. C'est pourquoi on corrèle habituellement l'augmentation de phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine avec l'augmentation de son pouvoir transcriptionnel (Roura et al., 1999 ; Monga et al., 2002).

Cependant, ces études sont en opposition directe avec une autre qui montre que la dissociation par phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine des complexes adhérents n'est pas suffisante à induire son activité transcriptionnelle (Kim et Lee, 2001).

Étant donné ces contradictions apparentes, nous avons tenté de clarifier le rôle de la phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine dans les cellules épithéliales intestinales. Dans un premier temps, nous avons testé l'effet de plusieurs facteurs de croissance, agissant via des récepteurs à activité tyrosine kinase, sur les capacités transcriptionnelles de la  $\beta$ -caténine. De façon générale, tous les facteurs de croissance testés tels HGF, EGF, insuline et le FBS doublent l'activité transcriptionnelle du complexe  $\beta$ -caténine/TCF (fig. 11). Le HGF, un facteur de croissance agissant via son récepteur à activité tyrosine kinase c-Met, est rapporté pour amener une augmentation de phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine ainsi qu'une translocation nucléaire de la protéine dans les hépatocytes (Monga et al., 2002). Nous avons alors vérifié si les niveaux de phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine étaient modulés après une stimulation au sérum, connu pour activer plusieurs récepteurs à activité tyrosine kinase. Nous avons été surpris de voir que le sérum n'induisait pas d'augmentation de la phosphorylation sur tyrosine. En fait, après 20 minutes de stimulation, on assistait à une forte diminution de la phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine (fig. 12A). L'activation simultanée de tyrosine kinases et phosphatases explique probablement pourquoi, suite à une stimulation au sérum, le niveau de phosphorylation globale sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine demeure inchangé jusqu'à 20 min. Par contre, ces jeux de phosphorylation devraient mener ultimement à la phosphorylation de résidus tyrosines essentiels à son activité transcriptionnelle puisque le

gène rapporteur TOP-FLASH est induit après une stimulation au sérum (fig. 12A). De manière très intéressante, nous avons observé que la baisse de phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine corrélait parfaitement avec la cinétique d'activation de SHP-1 par le sérum. Ceci suggère fortement que SHP-1 est responsable de cette diminution de phosphorylation sur tyrosine. Il est à noter que le sérum ou les facteurs de croissance peuvent influencer l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine non pas seulement en modulant sa phosphorylation sur tyrosine, mais fort probablement en modulant également sa phosphorylation sur sérine. En effet, il est bien connu que le sérum ou les facteurs de croissance activent la voie PI-3K/AKT, et que la kinase AKT phosphoryle et inactive GSK3 $\beta$  (Sharma et al., 2002). Ceci contribue à réduire la phosphorylation sur sérine de la  $\beta$ -caténine par GSK3 $\beta$ , menant ainsi à une stabilisation de la  $\beta$ -caténine et à une augmentation de son activité transcriptionnelle. Ainsi, il est possible que la phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine soit nécessaire pour lui conférer son activité transcriptionnelle sans être vraiment inductible par des facteurs de croissance dans les cellules épithéliales intestinales.

Plusieurs protéines modulatrices sont rapportées pour être recrutées au complexe  $\beta$ -caténine/TCF afin d'en moduler l'activité transcriptionnelle telles HDAC (Billin et al., 2000) et Brg (Barker et al., 2001). L'association de ces protéines est généralement dépendante de la phosphorylation ou de l'acétylation. Dans le but de réconcilier le rôle de la phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine et le rôle négatif de SHP-1 dans la cascade  $\beta$ -caténine/TCF, nous avons donc entrepris d'analyser plus en profondeur les sites de déphosphorylation potentiels par SHP-1 sur la  $\beta$ -caténine. Ceci dans le but de

déterminer si SHP-1 influençait, par déphosphorylation, le recrutement de protéines modulatrices à la  $\beta$ -caténine. Trois sites potentiels de déphosphorylation par SHP-1 ayant la séquence consensus hXY(p)XXh où h = acide aminé hydrophobe et X = acide aminé quelconque (Keilhack et al., 2000) ont été identifiés : la Tyr 333, la Tyr 604 et la Tyr 654. De façon intéressante, il a été récemment rapporté que la phosphorylation de la tyrosine 654 de la  $\beta$ -caténine entraîne sa dissociation d'avec la E-cadhérine tout en augmentant son association avec TBP (TATA-binding protein). Évidemment, la liaison de la  $\beta$ -caténine avec TBP favorise le recrutement de la machinerie transcriptionnelle conduisant à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle du complexe  $\beta$ -caténine/TCF. Nous avons donc vérifié si la surexpression de SHP-1WT dans les cellules HEK293 pouvait influencer l'association de la  $\beta$ -caténine avec TBP. Il s'est avéré que la surexpression de SHP-1 diminue de 30% l'association entre la  $\beta$ -caténine et TBP (fig. 13A), suggérant qu'effectivement, la déphosphorylation de la  $\beta$ -caténine sur tyrosine par SHP-1 diminue sa capacité d'interaction avec TBP.

Les résultats précédents permettent de proposer le mécanisme d'action potentiel de SHP-1 pour réguler négativement la prolifération des cellules épithéliales intestinales. En déphosphorylant la tyrosine 654 de la  $\beta$ -caténine nucléaire (site potentiel de déphosphorylation par SHP-1), SHP-1 empêcherait le recrutement de la machinerie transcriptionnelle au complexe  $\beta$ -caténine/TCF (fig. 22). Ceci diminuerait l'activité transcriptionnelle du complexe résultant ainsi en une diminution de l'expression des cibles de la voie tels c-myc et cycline D1. Cependant, il ne faut pas exclure la possibilité que SHP-1 puisse également moduler le recrutement d'autres protéines régulatrices à la

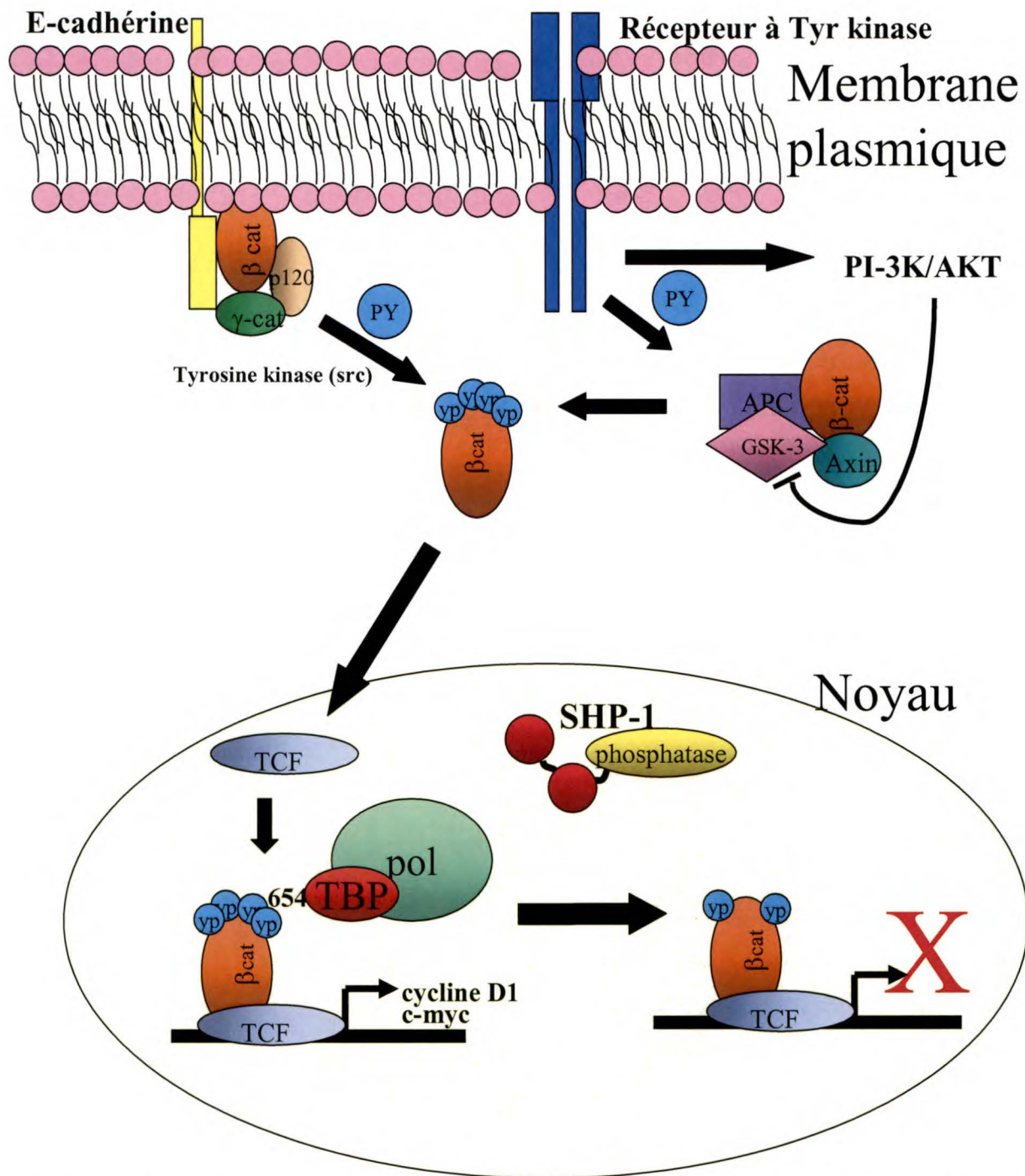
$\beta$ -caténine, ce qui pourrait également diminuer son activité transcriptionnelle. De toute évidence, ceci n'influence toutefois pas la capacité de liaison du complexe  $\beta$ -caténine/TCF à l'ADN. Des résultats préliminaires dans notre laboratoire, semblent suggérer qu'effectivement, la phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine soit nécessaire à son activité transcriptionnelle. En effet, la mutation de la tyrosine 654 par une phénylalanine inhibe fortement l'activation du gène rapporteur TOP-FLASH dans les cellules HIEC (Résultats préliminaires, Mélanie Simoneau).

Les fonctions de SHP-1 sur la voie  $\beta$ -caténine/TCF se reflètent également dans les modèles *in vivo* de souris *motheaten*<sup>y</sup>. Possédant une mutation dans le domaine phosphatase de la protéine, ces souris ne conservent que 20% de l'activité phosphatase de SHP-1 (Kozlowski et al., 1993). Nos résultats démontrent que les niveaux de phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine sont légèrement augmentés dans le côlon de ces souris (fig.14A). Nous n'avons pas été en mesure de détecter de la phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine dans le jéjunum des souris *motheaten*<sup>y</sup>. Nous pensons que les niveaux de  $\beta$ -caténine, étant nettement inférieurs à ceux observés dans le côlon, sont trop faibles pour arriver à détecter quelque phosphorylation sur tyrosine que ce soit. Considérant que l'activité de SHP-1 est compromise dans les souris *motheaten*<sup>y</sup>, on s'attendait à ce que ses substrats présentent une plus forte phosphorylation sur tyrosine. Ceci a été noté plusieurs fois pour certains autres substrats de SHP-1 comme le récepteur Ros (Keilhack et al., 2001). Nous avons également montré une hausse d'expression de c-myc et cycline D1, deux protéines dont les gènes sont des cibles de la voie  $\beta$ -caténine/TCF (fig.15 A et B). Malheureusement, l'induction de ces protéines, impliquées

dans la prolifération, ne semble pas suffisante pour mener à une hyperprolifération dans l'intestin des souris *motheanten*<sup>y</sup> vs contrôles. En effet, l'incorporation de BrDu, ne nous a pas permis d'identifier des différences majeures dans la prolifération et ce, autant dans le côlon que dans le jéjunum (fig. 16A et B). Sachant que les souris *motheaten* présentent habituellement une hyperprolifération des cellules hématopoïétiques (Shultz et al 1993), on peut se questionner sur le rôle de SHP-1 dans l'intestin. Il est fort probable que dans l'intestin, l'activité résiduelle de SHP-1 (environ 20%) soit suffisante à contrôler l'activité transcriptionnelle du complexe  $\beta$ -caténine/TCF. La compensation par d'autres types de tyrosine phosphatases est également une autre possibilité. Néanmoins, tous les résultats obtenus dans les souris tendent à montrer que la phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine corrèle avec une augmentation de ses capacités transcriptionnelles. Ils confirment également l'implication de SHP-1 dans le contrôle de la voie  $\beta$ -caténine/TCF. Ces études démontrent donc que SHP-1 contrôle négativement la voie  $\beta$ -caténine/TCF donc, la prolifération cellulaire des cellules épithéliales intestinales (voir figure 22 sur le modèle hypothétique de SHP-1 dans le contrôle de la prolifération des cellules intestinales).

### **3. Implication de SHP-1 dans la prolifération des populations inductibles.**

La mise au point de populations surexprimant SHP-1 et SHP-1C/S sous le contrôle d'un promoteur inductible nous a permis d'étudier un peu plus le rôle de SHP-1 dans le contrôle de la prolifération. Dans un premier temps, nous avons montré la validité



**Figure 22. Modèle hypothétique du rôle de SHP-1 dans le contrôle de la voie  $\beta$ -caténine/TCF.**

La  $\beta$ -caténine phosphorylée sur tyrosine par les récepteurs à activité tyrosine kinase et les tyrosine kinase de type src s'accumule dans le cytosol. Elle transloque ensuite au noyau pour s'associer au facteur de transcription TCF. Lorsque la phosphorylation sur tyrosine survient sur la tyr 654 de la  $\beta$ -caténine, la protéine TBP, associée à la machinerie transcriptionnelle de base, se fixe au complexe  $\beta$ -caténine/TCF pour induire les gènes cycline D1 et c-myc. L'activation nucléaire de SHP-1 permet la déphosphorylation de cette tyrosine spécifique menant ainsi à l'arrêt de la transcription et du signal de prolifération.



du système inductible par une augmentation de l'expression de SHP-1WT et SHP-1 C/S en présence de l'agent inducteur, la doxycycline.

Parallèlement à ceci, nous avons étudié l'expression de la cycline D1, une des protéines induites par l'activation de la voie  $\beta$ -caténine/TCF. La surexpression de SHP-1 durant 64 hrs conduit à une diminution de 50% de l'expression de cette protéine alors que la présence du mutant catalytiquement inactif est sans effet majeur (fig.18A). Ce résultat tend à renforcer, une fois de plus, le rôle joué par SHP-1 dans le contrôle négatif de la voie  $\beta$ -caténine/TCF. En contrôlant négativement l'activité transcriptionnelle du complexe  $\beta$ -caténine/TCF dans les cellules épithéliales intestinales, SHP-1 parvient à inhiber l'expression de protéines cibles de cette voie de signalisation telles cycline D1.

#### **4. Rôles potentiels de l'association entre SHP-1 et CDK2.**

Les études de double hybride nous ont permis d'identifier CDK2 comme un autre partenaire de SHP-1 dans les cellules épithéliales intestinales. L'association entre ces deux protéines a été confirmée par surexpression dans les cellules HEK293 ainsi que de façon endogène dans les cellules Caco-2/15 et HIEC (fig. 20 et 21). Dans les cellules Caco-2/15 et HIEC, on assiste à une légère diminution de l'interaction entre les 2 protéines après la confluence (fig. 20A et B). Nous avons également démontré que SHP-1 pouvait être phosphorylée par CDK2 par un essai kinase utilisant CDK2 recombinante (fig. 21).

L'interaction entre ces 2 protéines est très intéressante. D'une part, CDK2 est une Ser/Thr kinase possédant de multiples substrats. L'activité de cette enzyme détermine l'entrée en phase S des cellules intestinales suite à son association avec sa sous-unité régulatrice, la cycline E. Comme l'importance de CDK2 dans le contrôle du cycle cellulaire n'est plus à démontrer, nous avons d'abord pensé que CDK2 pouvait phosphoryler SHP-1 et peut-être, influencer son activité phosphatasique. Nous avons en effet, trouvé un site consensus de phosphorylation par CDK2 dans la séquence de SHP-1 correspondant S/T-P-X-K/R où S/T=Ser/Thr P= Pro et K/R=Arg/Asp et X=acide aminé quelconque. De façon très intéressante, ce site de phosphorylation se situe dans le domaine c-SH2 de SHP-1. Les domaines SH2 ont une importance capitale dans l'activation de SHP-1. En plus de permettre le recrutement de SHP-1 à des tyrosines phosphorylées sur d'autres protéines, ils sont également responsables de la régulation de l'activation de l'enzyme. En se repliant sur le domaine phosphatase, ils participent à l'autoinhibition de la protéine (Pei et al., 1996). On peut donc penser que la phosphorylation amenée par CDK2 pourrait conduire à une diminution de l'activité phosphatase de SHP-1 en promouvant le repliement de la protéine. Une étude, parue en 1997 par Brumell et *al.* a d'ailleurs permis de démontrer que la PKC, une autre Ser/Thr kinase, inhibait l'activité de SHP-1. Nous avons donc de bonnes raisons de postuler que CDK2 pourrait aussi régulariser l'activité de SHP-1. D'autant plus que la forte activité de CDK2 dans les cellules prolifératives (Deschênes et al., 2001) pourrait expliquer la faible activité de SHP-1 dans les modèles cellulaires intestinaux à sous confluence (fig. 4). Et comme nous montrons une implication de SHP-1 dans le contrôle négatif de la prolifération, CDK2 pourrait prévenir l'activité de SHP-1 dans les cellules prolifératives.

Ceci expliquerait, par le fait même, une plus forte association entre les protéines à sous-confluence dans les cellules Caco-2/15 et HIEC.

Cependant, il ne faut pas non plus négliger la possibilité que SHP-1 puisse amener une déphosphorylation sur tyrosine de CDK2. En effet, dans les études de surexpression avec SHP-1 mutant C/S et CDK2, une plus forte association entre les deux protéines est observée (fig. 18A). Sachant que les mutants inactifs des tyrosine phosphatases séquestrent leur substrat, on peut penser que CDK2 en est justement un. L'activation complète des complexes cycline/CDK requiert leur phosphorylation sur résidu thréonine par la CAK (CDK-activating kinase). Cependant, les tyrosine kinases régulatrices Wee1 et Mic 1 peuvent mener à l'inactivation des complexes. Leur activité peut toutefois être rétablie par l'action de phosphatases à double spécificité Ser/Thr et Tyr telles Cdc25. Il se trouve que SHP-2, une tyrosine phosphatase du même type que SHP-1, peut déphosphoryler autant sur résidus tyrosine que sérine (Wu et al., 2002). Étant donné que SHP-1 et SHP-2 ont une homologie de 60% ainsi que des domaines protéiques très semblables, on peut spéculer que SHP-1 pourrait posséder cette capacité de double spécificité de déphosphorylation. Ceci s'avère d'autant plus intéressant puisque CDK2 possède dans sa séquence, des sites de déphosphorylation par SHP-1. Ainsi, SHP-1 pourrait, en déphosphorylant sur résidus sérine et tyrosine, contribuer à la réactivation des complexes cycline/CDK au même titre que Cdc25. Certains travaux réalisés dans le laboratoire ont permis de démontrer une forte activité CDK2 dans les cellules prolifératives intestinales (Deschênes et al., 2001). Il se pourrait que SHP-1, bien que son activité soit très faible dans les cellules sous-confluentes prolifératives, participe

faiblement au maintien de l'activité CDK2. Cette nouvelle hypothèse va à l'encontre du rôle négatif que nous proposons ici pour SHP-1 dans la prolifération. Cependant, il est rapporté que SHP-1 peut avoir un effet positif sur la signalisation de certains mitogènes dans les cellules HEK293 et HeLa (Su et al., 1996 ; You et Zhao, 1997).

Les résultats obtenus suggèrent que l'association entre SHP-1 et CDK-2 pourrait être coopérative. D'une part, CDK2 pourrait permettre une régulation de l'activité de SHP-1, qui inversement provoquerait une modification de l'activité CDK2. Cependant, plusieurs autres études devront être effectuées avant de confirmer cette affirmation.

## **5. Conclusions et perspectives**

Tous les résultats obtenus dans la présente étude nous permettent de conclure que SHP-1 est impliquée dans la régulation négative de la prolifération des cellules épithéliales intestinales. L'augmentation de l'activité de l'expression de SHP-1 dans les cellules intestinales en arrêt de prolifération et en processus de différenciation renforce le rôle qui nous lui prêtons. Des études de transfections transitoires ont permis de montrer que SHP-1 inhibait l'expression de plusieurs marqueurs de prolifération tels c-myc, dhfr et cycline D1. Puis d'autres transfections nous ont permis d'établir que SHP-1 médiait son effet en inhibant plus spécifiquement l'activité transcriptionnelle du complexe  $\beta$ -caténine/TCF. Nous avons démontré que SHP-1 pouvait s'associer à la  $\beta$ -caténine dans les modèles cellulaires. Puis, en vue d'identifier le mécanisme d'action de SHP-1, nous avons établi que SHP-1 n'influait pas la capacité de liaison à l'ADN du complexe  $\beta$ -

caténine/TCF. Nous avons plutôt montré que la  $\beta$ -caténine était un substrat de déphosphorylation par SHP-1. Cette déphosphorylation possiblement, sur le résidu tyrosine 654, menerait à une perte d'interaction entre la  $\beta$ -caténine et TBP et à une diminution des capacités transcriptionnelles de la  $\beta$ -caténine. Il serait intéressant de pousser l'effet d'une mutation de cette tyrosine 654 en phénylalanine ou en acide aspartique sur les capacités transcriptionnelles de la  $\beta$ -caténine, mais également sur la stabilité de la protéine. Bien que les rôles de la phosphorylation sur Ser/Thr de la  $\beta$ -caténine soient très importants pour sa dégradation, très peu de choses sont connues sur le rôle de la phosphorylation sur tyrosine dans ce processus. L'analyse des rôles de la phosphorylation sur tyrosine sur la stabilité et sur l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine sont des expériences qui mériteraient d'être entreprises.

L'analyse des souris *motheaten*<sup>v</sup> a permis de confirmer que certains gènes cibles de la voie  $\beta$ -caténine/TCF sont fortement induits dans le côlon et le jéjunum. L'induction de ces gènes semblait également corrélérer avec une augmentation de phosphorylation sur tyrosine du moins, dans le côlon. Toutefois, la prolifération par incorporation de BrDu dans l'intestin de ces souris n'est pas affectée, malgré la forte induction de c-myc et de cycline D1. Il serait intéressant de vérifier l'interaction de la  $\beta$ -caténine avec TBP dans ces souris. De plus, l'identification des gènes induits dans l'intestin de ces souris par micro-puce d'ADN fournirait plusieurs explications quant au rôle de SHP-1 sur l'expression des gènes spécifiques à l'épithélium intestinal.

L'analyse des populations stables inductibles pour SHP-1 nous a permis de montrer encore une fois l'implication de SHP-1 dans la prolifération des cellules intestinales. La mise au point de ces populations s'avère prometteuse pour des perspectives futures. Il sera possible, au moyen de ces cellules, de confirmer l'interaction entre TBP et la  $\beta$ -caténine. L'analyse de la stabilité de la  $\beta$ -caténine et l'analyse de la prolifération figure également dans les projets.

Les études de double hybride ont permis de montrer une interaction entre SHP-1 et CDK2 dans les cellules intestinales. Jusqu'à maintenant, les études entreprises ne nous ont pas permis d'aller plus en profondeur dans l'étude fonctionnelle de cette interaction mis à part que CDK2 peut phosphoryler SHP-1. L'analyse de l'activité SHP-1 en présence de CDK2 et réciproquement constitue des expériences qui devront être tentées.

Aussi, comme l'activité ainsi que l'expression de SHP-1 sont augmentées dans les cellules Caco-2/15 en cours de différenciation, il faudrait investiguer le rôle de SHP-1 dans la différenciation entérocytaire.

Également, il serait intéressant de vérifier l'activité de SHP-1 dans des biopsies de cancers colorectaux, de maladies inflammatoires intestinales caractérisées par une hyperprolifération cryptale. La modulation de son activité en réponse à des cytokines, au TGF $\beta$  et autres figure également dans les projets d'avenir.

En conclusion, ce travail aura permis d'identifier pour la première fois le mécanisme d'action de SHP-1 dans le contrôle la prolifération des cellules intestinales. Cette régulation implique l'inhibition de la voie  $\beta$ -caténine/TCF, une voie de signalisation mutée dans plus de 90% des cancers colorectaux.

## REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier la personne sans qui tout ce travail aurait été impossible. Merci Nathalie pour les connaissances scientifiques inépuisables et pour ton enthousiasme toujours grandissant envers la science. Tu as su, tout au long de mon séjour, transmettre cette passion à l'ensemble du laboratoire. Tes qualités autant morales que scientifiques font de toi une grande chercheuse.

Je voudrais également remercier mes collègues de travail. D'abord Marie-Josée Boucher, pour m'avoir initiée à la recherche dans le laboratoire. Merci également à Anne Vézina, Claude Deschênes, Jim Boulanger, Patrick Laprise, Jean Lainé pour leur compagnie agréable, mais également pour la transmission de leur savoir scientifique et de leurs nombreux conseils.

Finalement, je tiens à remercier les Drs Nathalie Perreault et Richard Blouin pour avoir parcouru et corrigé ce mémoire.



## BIBLIOGRAPHIE

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R., 1997, beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway., *EMBO J*, **13**, 3797-804
- Aliaga JC, Deschenes C, Beaulieu JF, Calvo EL, Rivard N, 1999, Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells., *Am J Physiol*, **277(3 Pt 1)**, G631-41
- Angel P, Karin M, 1991, The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation., *Biochim Biophys Acta*, **1072(2-3)**, 129-57
- Arrandale JM, Gore-Willse A, Rocks S, Ren JM, Zhu J, Davis A, Livingston JN, Rabin DU, 1996, Insulin signaling in mice expressing reduced levels of Syp., *J Biol Chem*, **271(35)**, 21353-8
- Bach SP, Renehan AG, Potten C.S, 2000, Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm., *Carcinogenesis*, **21**, 469-76
- Barker N, Hurlstone A, Musisi H, Miles A, Bienz M, Clevers H, 2001, The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation., *EMBO J*, **20(17)**, 4935-43
- Beaulieu JF, Quaroni A, 1991, Clonal analysis of sucrase isomaltase expression in the human colon adenomacarcinoma Caco-2 cells., *Biochem J*, **280**, 599-608
- Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, Van Roy F, Mareel MM, Birchmeier W, 1993, Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene., *J Cell Biol*, **3**, 757-66
- Billin AN, Thirlwell H, Ayer DE, 2000, Beta-catenin-histone deacetylase interactions regulate the transition of LEF1 from a transcriptional repressor to an activator., *Mol Cell Biol*, **20(18)**, 6882-90
- Blenis J, 1993, Signal transduction via the MAPkinases: proceed at your own RSK., *Proc Nat Acad Sci USA*, **90**, 5889-92
- Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T, 1999, beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer., *Am J Pathol*, **155(4)**, 1033-8
- Brabletz T, Jung A, Hermann K, Gunther K, Hohenberger W, Kirchner T, 1998, Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front., *Pathol Res Pract*, **10**, 701-4
- Brady-Kalnay SM, Rimm DL, Tonks NK., 1995, Receptor protein tyrosine phosphatase PTPmu associates with cadherins and catenins in vivo., *J Cell Biol*, **4**, 977-86

- Braga VM, 2002, Cell-cell adhesion and signalling., *Current Opinion in Cell Biology*, **14**, 546-56
- Bright-Thomas RM, Hargest R, 2003, APC, beta-Catenin and hTCF-4; an unholy trinity in the genesis of colorectal cancer., *Eur J Surg Oncol*, **29(2)**, 107-17
- Brumell JH, Chan CK, Butler J., Borregaard N., Siminovitch KA., Grinstein S, Downey GP, 1997, Regulation of Src Homology 2-containing tyrosine phosphatase 1 during activation of human neutrophils., *J Biol Chem*, **272(10)**, 875-82
- Byon JC, Kenner KA, Kusari AB, Kusari J, 1997, Regulation of growth factor-induced signaling by protein-tyrosine-phosphatases., *Proc Soc Exp Biol Med*, **1**, 1-20
- Byth KF, Conroy LA, Howlett S, Smith AJ, May J, Alexander DR, Holmes N, 1996, CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4+CD8+ thymocytes, and B cell maturation., *J Exp Med*, **4**, 1707-18
- Carlsson P, Waterman ML, Jones KA, 1993, The hLEF/TCF-1 alpha HMG protein contains a context-dependent transcriptional activation domain that induces the TCR alpha enhancer in T cells., *Genes Dev*, **12A**, 2418-30
- Cayabyab FS, Tsui FW, Schlichter LC, 2002, Modulation of the ERG K<sup>+</sup> current by the tyrosine phosphatase., SHP-1, *J Biol Chem*, **277(50)**, 48130-8
- Charbonneau H, Tonks NK, 1992, 1002 protein phosphatases?, *Annu Rev Cell Biol*, **8**, 463-93
- Chi SG, Kim HJ, Park BJ, Min HJ, Park JH, Kim YW, Dong SH, Kim BH, Lee JI, Chang YW, Chang R, Kim WK, Yang MH, 1998, Mutational abrogation of the PTEN/MMAC1 gene in gastrointestinal polyps in patients with Cowden disease., *Gastroenterology*, **5**, 1084 -9
- Chiariello M, Marinissen MJ, Gutkind JS, 2001, Regulation of c-myc expression by PDGF through Rho GTPases., *Nat Cell Biol*, **3(6)**, 580-6
- Chiu T, Santiskulvong C, Rozengurt E., 2000, ANG II stimulates PKC-dependent ERK activation, DNA synthesis, and cell division in intestinal epithelial cells., *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **285(1)**, G1-G11
- Classon M, Harlow, E, 2002, The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer., *Nat Rev Cancer*, **12**, 910-7
- Collado M, Medema RH, Garcia-Cao I, Dubuisson ML, Barradas M, Glassford J, Rivas C, Burgering BM, Serrano M, Lam EW, 2002, Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1., *J Biol Chem*, **29**, 21960-8

- Conacci-Sorell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A, 2002, The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer., *The J Clin Inves*, **109**, 987-91
- Craggs G, Kellie S, 2001, A functional nuclear localization sequence in the C-terminal domain of SHP-1., *J Biol Chem*, **276(26)**, 23719-25
- Aliaga J, Deschênes C, Beaulieu J-F, Calvo EL, Rivard N, 1999, requirement of the MAPkinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells., *Am J Physiol*, **277**, G631-G641.
- Cuevas B, Lu Y, Watt S, Kumar R, Zhang J, Siminovitch KA, Mills GB, 1999, SHP-1 regulates Lck-induced phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation and activity., *J Biol Chem*, **274(39)**, 27583-9
- Dale TC, 1998, Signal transduction by the Wnt family of ligands., *Biochem J*, **329** ( Pt 2), 209-23
- Daniel JM, Reynolds AB, 1997, Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function., *Bioessays*, **19(10)**, 883-91
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME, 1999, Cellular survival: a play in three Akts., *Genes Dev*, **22**, 2905-27
- Davies MA, Lu Y, Sano T, Fang X, Tang P, LaPushin R, Koul D, Bookstein R, Stokoe D, Yung WK, Mills GB, Steck PA, 1998, Adenoviral transgene expression of MMAC/PTEN in human glioma cells inhibits Akt activation and induces anoikis., *Cancer Res*, **23**, 5285-90
- Deschênes C, Vézina A, Beaulieu JF, Rivard N, 2001, Role of p27<sup>kip1</sup> in human intestinal cell differentiation., *Gastroenterology*, **120**, 423-38
- Draetta G, Eckstein J, 1997, Cdc25 protein phosphatases in cell proliferation., *Biochim Biophys Acta*, **1332(2)**, M53-63
- Duyao MP, Kessler DJ, Spicer DB, Bartholomew C, Cleveland JL, Siekevitz M, Sonenshein GE, 1992, Transactivation of the c-myc promoter by human T cell leukemia virus type 1 tax is mediated by NF kappa B., *J Biol Chem*, **267(23)**, 16288-91
- Eklund EA, Goldenberg I, Lu Y, Andrejic J, Kakar R, 2002, SHP1 protein-tyrosine phosphatase regulates HoxA10 DNA binding and transcriptional repression activity in undifferentiated myeloid cells., *J Biol Chem*, **277(39)**, 36878-88
- Feng GS, Hui CC, Pawson T, 1993, SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases., *Science*, **259(5101)**, 1607-11

- Flint AJ, Tiganis T, Barford D, Tonks NK, 1997, Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases., *Proc Natl Acad Sci U S A* , **94**(5), 1680-5
- Gille H, Sharrocks AD, Thomae O, Moomaw C, Slaughter C, Cobb MH, Shaw PE, 1992, ERK phosphorylation potentiates ELK-1-mediated ternary complex formation and transactivation., *EMBO*, **14**, 951-62
- Glockner S, Buurman H, Kleeberger W, Lehmann U, Kreipe H, 2002, Marked intratumoral heterogeneity of c-myc and cyclinD1 but not of c-erbB2 amplification in breast cancer., *Lab Invest*, **82**(10), 1419-26
- Gordon JI, et Herminston ML, 1994, Differentiation and self-renewal in the mouse gastrointestinal epithelium., *Current Opinion in Cell Biology*, **6**, 795-803
- Green MC, Shultz LD, 1975, Motheaten, an immunodeficient mutant of the mouse. I. Genetics and pathology., *J Hered*, **66**(5), 250-8
- Guan KL, Dixon JE, 1991, Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate., *J Biol Chem*, **266**, 17026-30
- Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS Jr, 1999, NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1., *Mol Cell Biol*, **19**(8), 5785-99
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW, 1998, Identification of c-MYC as a target of the APC pathway., *Science*, **281**(5382), 1509-12
- Hermiston ML, Gordon JI, 1995, In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death., *J Cell Biol*, **129**(2), 489-506
- Howe LR, Subbaramaiah K, Chung WJ, Dannenberg AJ, Brown AM, 1999, Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in Wnt-1-transformed mouse mammary epithelial cells., *Cancer Res*, **59**(7), 1572-7
- Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G, Birchmeier W, 2001, beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin., *Cell*, **104**, 533-45
- Hunter T, 1995, Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signalling., *Cell*, **80**, 225-36
- Ito S, 1965, The enteric surface coat on cat intestinal microvilli., *J Cell Biol*, **27**(3), 475-91

- Jasleen J, Ashley SW, Shimoda N, Zinner MJ, Whang EE, 2000, Glucagon-like peptide 2 stimulates intestinal epithelial proliferation in vitro., *Dig Dis Sci*, **47(5)**, 1135-40
- Jiang BH, Zheng JZ, Vogt PK, 1998, An essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in myogenic differentiation., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **24**, 14179-83
- Keilhack H, Hellman U, van Hengel J, van Roy F, Godovac-Zimmermann J, Bohmer FD, 2000, The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 binds to and dephosphorylates p120 catenin., *J Biol Chem*, **275(34)**, 26376-84
- Keilhack H, Muller M, Bohmer SA, Frank C, Weidner KM, Birchmeier W, Ligensa T, Berndt A, Kosmehl H, Gunther B, Muller T, Birchmeier C, Bohmer FD, 2001, Negative regulation of Ros receptor tyrosine kinase signaling. An epithelial function of the SH2 domain protein tyrosine phosphatase SHP-1., *J Cell Biol*, **152(2)**, 325-34
- Kim K, Lee KY, 2001, Tyrosine phosphorylation translocates beta-catenin from cell-cell interface to the cytoplasm, but does not significantly enhance the LEF-1-dependent transactivating function., *Cell Biol Int*, **25(5)**, 421-7
- Kinzler KW, Vogelstein B, 1996, Lessons from hereditary colorectal cancer., *Cell*, **87(2)**, 159-70
- Kitagawa M, Higashi H, Jung HK, Suzuki-Takahashi I, Ikeda M, Tamai K, Kato J, Segawa K, Yoshida E, Nishimura S, Taya Y, 1996, The consensus motif for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different from that for phosphorylation by cyclin A/E-Cdk2., *EMBO J*, **15(24)**, 7060-9
- Klingmuller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF, 1995, Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals., *Cell*, **80(5)**, 729-38
- Klippel A, Escobedo MA, Wachowicz MS, Apell G, Brown TW, Giedlin MA, Kavanaugh WM, Williams LT, 1998, Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient for cell cycle entry and promotes cellular changes characteristic of oncogenic transformation., *Mol Cell Biol*, **10**, 5699-711
- Kolligs FT, Bommer G, Goke B, 2002, Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis., *Digestion*, **66(3)**, 131-44
- Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, Clevers H, 1998, Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4., *Nat Genet*, **4**, 379-83
- Kozlowski M, Mlinaric-Rascan I, Feng GS, Shen R, Pawson T, Siminovich KA, 1993, Expression and catalytic activity of the tyrosine phosphatase PTP1C is severely impaired in motheaten and viable motheaten mice., *J Exp Med*, **178(6)**, 2157-63

- Kusari AB, Byon J, Bandyopadhyay D, Kenner KA, Kusari J, 1997, Insulin-induced mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 (MKP-1) attenuates insulin-stimulated MAP kinase activity: a mechanism for the feedback inhibition of insulin signalling., *Mol Endocrinol*, **10**, 1532-43
- Laprise P, Chailler P, Houde M, Beaulieu JF, Boucher MJ, Rivard N, 2002, Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation., *J Biol Chem*, **10**, 8226-34
- La Thangue NB, 1994, DP and E2F proteins : component of a heterometric transcription factor implicated in cell cycle control., *Curr Opin Cell Biol*, **6**, 443-450
- Lavoie JN, Rivard N, L'Allemain G, Pouyssegur J, 1996, A temporal and biochemical link between growth factor-activated MAP kinases, cyclin D1 induction and cell cycle entry., *Prog Cell Cycle Res*, **2**, 49-58
- Levinson AD, Oppermann H, Varmus HE, Bishop JM, 1980, The purified product of the transforming gene of avian sarcoma virus phosphorylates tyrosine., *J Biol Chem*, **24**, 11973-80
- Levy DE, Darnell JE Jr, 2002, Stats: transcriptional control and biological impact., *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**(9), 651-62
- Li W, Nishimura R, Kashishian A, Batzer AG, Kim WJ, Cooper JA, Schlessinger J, 1994, A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase., *Mol Cell Biol*, **14**(1), 509-17
- Li Y, Ren J, Yu W, Li Q, Kuwahara H, Yin L, Carraway KL 3rd, Kufe D, 2001, The epidermal growth factor receptor regulates interaction of the human DF3/MUC1 carcinoma antigen with c-Src and beta-catenin., *J Biol Chem*, **38**, 35239-42
- Linnekin D, Evans GA, D'Andrea A, Farrar WL, 1992, Association of the erythropoietin receptor with protein tyrosine kinase activity., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(14), 6237-41
- Marais R, Wynn J, Treisman R, 1993, the SRF accessory protein ELK-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain., *Cell*, **73**, 381-393
- Mariadason JM, Bordonaro M, Aslam F, Shi L, Kuraguchi M, Velcich A, Augenlicht LH, 2001, Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation., *Cancer Res*, **61**(8), 3465-71
- Marieb EN, Anatomie et physiologie humaines, Éditions du nouveau pédagogique Inc., St-Laurent, Qc, pp861
- Massey-Harroche D, 2000, Epithelial cell polarity as reflected in enterocytes., *Microscopy Research and Technique*, **49**, 353-62

- May RJ, Quaroni A, Kirsch K, Isselbacher KJ, 1981, A villous cell-derived inhibitor of intestinal cell proliferation., *Am J Physiol*, **241**(6), G520-7
- Misawa A, Hosoi H, Arimoto A, Shikata T, Akioka S, Matsumura T, Houghton PJ, Sawada T, 2000, N-Myc induction stimulated by insulin-like growth factor I through mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human neuroblastoma cells., *Cancer Res*, **60**(1), 64 -9
- Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H, 1996, XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos., *Cell*, **3**, 391-9
- Monga SP, Mars WM, Pediaditakis P, Bell A, Mule K, Bowen WC, Wang X, Zarnegar R, Michalopoulos GK, 2002, Hepatocyte growth factor induces Wnt-independent nuclear translocation of beta-catenin after Met-beta-catenin dissociation in hepatocytes., *Cancer Res*, **7**, 2064-71
- Morgan DO, 1997, Cyclin-dependant kinases: engines, clocks and micorprocessors., *Ann Rev Cell Dev Biol*, **13**, 261-91
- Morin PJ, 1999, beta-catenin signaling and cancer., *Bioessays*, **12**, 1021-30
- Muller T, Choidas A, Reichmann E, Ullrich A, 1999, Phosphorylation and free pool of beta-catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration., *J Biol Chem*, **15**, 10173-83
- Murphy M, Stephen G, 1998, Growth factors and gastrointestinal tract., *Nutrition*, **10**, 771-74
- Nelson BH, McIntosh BC, Rosencrans LL, Greenberg PD, 1997, Requirement for an initial signal from the membrane-proximal region of the interleukin 2 receptor gamma(c) chain for Janus kinase activation leading to T cell proliferation., *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**(5), 1878-83
- Northwood IC, Gonzalez FA, Wartmann M, Raden DL, Davis RJ, 1991, Isolation and characterization of two factor stimulated protein kinases that phosphorylate de epidermal growth facor receptor at threonine 169., *J Bio Chem.*, **266**, 15266-76
- Okada N, Wada K, Goldsmith BA, Koizumi S, 1996, SHP-2 is involved in neurotrophin signalling., *Biochem Biophys Res Commun*, **229**(2), 607-11
- Ong SH, Hadari YR, Gotoh N, Guy GR, Schlessinger J, Lax I, 2001, Stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by fibroblast growth factor receptors is mediated by coordinated recruitment of multiple docking proteins., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **11**, 6074 -9

Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R, 1999, E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation., *J Cell Sci* , **112** ( Pt 8), 1237-45

Oving IM, Clevers HC, 2002, Molecular causes of colon cancer., *Eur J Clin Invest*, **32**(6), 448-57

Pages G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Meoche S, Pouyssegur P, 1993, Mitogen-activated protein kinase p42 and p44 are required for fibroblast proliferation., *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 8319-23

Paling NR, Welham MJ, 2002, Role of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 (Src homology phosphatase-1) in the regulation of interleukin-3-induced survival, proliferation and signalling., *Biochem J*, **368**, 885-94

Pani G, Kozlowski M, Cambier JC, Mills GB, Siminovitch KA, 1995, Identification of the tyrosine phosphatase PTP1C as a B cell antigen receptor-associated protein involved in the regulation of B cell signalling., *J Exp Med*, **181**(6), 2077-84

Pardee AB, 1989, G1 events and regulation of cell proliferation., *Science*, **246**, 603-8

Pei D, Wang J, Walsh C.H, 1996, Differential functions of the two src homology 2 domains in protein tyrosine phosphatase SH-PTP1., *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 1141-5

Peles E, Nativ M, Campbell PL, Sakurai T, Martinez R, Lev S, Clary DO, Schilling J, Barnea G, Plowman GD, 1995, The carbonic anhydrase domain of receptor tyrosine phosphatase beta is a functional ligand for the axonal cell recognition molecule contactin., *Cell*, **2**, 251-60

Peyssonnaud C, Eychene A, 2001, The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation., *Biol Cell*, **93**(1-2), 53-62

Perreault N, Beaulieu JF, 1996, Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures., *Exp Cell Res*, **224**(2), 354-64

Piedra J, Martinez D, Castano J, Miravet S, Dunach M, de Herreros AG, 2001, Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation., *J Biol Chem*, **276**(23), 20436-43

Pines J, 1993, Cyclins and cyclin-dependent kinases: take your partners., *Trends Biochem Sci*, **6**, 195-7

Pipas JM, Pogue-Geile K, Finley GG, Cartwright CA, Meiesler AI, 1993, Gene structure and expression in colorectal cancer., *Adv Exp Med Biol* , **330**, 67-75

Podolsky DK, Babyatsky M W, 1995 Textbook of Gastroenterology, second edition by Tadataka Yamada, Philadelphia, USA , pp561



- Pokutta S, Weis WI, 2002, The cytoplasmic face of cell contact sites., *Curr Opin Struct Biol*, **12**(2), 255-62
- Polakis P, Hart M, Rubinfeld B, 1999, Defects in the regulation of beta-catenin in colorectal cancer., *Adv Exp Med Biol*, **470**, 23-32
- Ray LB, Sturgill TW, 1987, Rapid stimulation by insulin of serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylate microtubule-associated protein 2 in vitro., *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**, 1502-6
- Reynisdottir I, Massague J, 1997, The subcellular localisations of p15 and p27 coordinate their inhibitory interactions with cdk4 et cdk2., *Genes Dev*, **11**, 492-503
- Rivard N, Boucher MJ, Asselin C, L'Allemain G, (1999) MAPkinase cascade is required for p27 downregulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells., *Am J Physiol*, **277**, c652-64
- Rivard N, McKenzie FR, Brondello JM, Pouyssegur J, 1995, The phosphotyrosine phosphatase PTP1D, but not PTP1C, is an essential mediator of fibroblast proliferation induced by tyrosine kinase and G protein-coupled receptors., *J Biol Chem*, **270**(18), 11017-24
- Roose J, Molenaar M, Peterson J, Hurenkamp J, Brantjes H, Moerer P, van de Wetering M, Destree O, Clevers H, 1998, The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors., *Nature*, **6702**, 608-12
- Roura S, Miravet S, Piedra J, Garcia de Herreros A, Dunach M, 1999, Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation., *J Biol Chem*, **274**(51), 36734-40
- Sasaki CY, Lin H, Morin PJ, Longo DL, 2000, Truncation of the extracellular region abrogates cell contact but retains the growth-suppressive activity of E-cadherin., *Cancer Res*, **60**(24), 7057-65
- Seeling JM, Miller JR, Gil R, Moon RT, White R, Virshup DM, 1998, Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A., *Science*, **5410**, 2089-91
- Seely BL, Reichart DR, Staubs PA, Jhun BH, Hsu D, Maegawa H, Milarski KL, Saltiel AR, Olefsky JM, 1995, Localization of the insulin-like growth factor I receptor binding sites for the SH2 domain proteins p85, Syp, and GTPase activating protein., *J Biol Chem*, **270**(32), 19151-7
- Seth A, Gonzalez FA, Gupta S, Raden JM, Clurman BE, 1992, Signal transcription within the nucleus by mitogen-activated protein kinase., *J Biol Chem*, **267**, 24796-804

- Sharma M, Chuang WW, Sun Z, 2002, Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt stimulates androgen pathway through GSK3beta inhibition and nuclear beta-catenin accumulation., *J Biol Chem*, **277**(34), 30935-41
- Sherr C, 1994, G1 phase progression: cycling on cue., *Cell*, **79**, 551-5
- Shultz LD, Coman DR, Bailey CL, Beamer WG, Sidman CL., 1984, "Viable motheaten," a new allele at the motheaten locus. I. Pathology., *Am J Pathol*, **116**(2), 179-92
- Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H, 2002, The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells., *Cell*, **2**, 241-50
- Stappenbeck TS, Wong MH, Saam JR, Mysorekar IU, Gordon JI, 1998, Notes from the crypt watcher; regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium., *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 702-9
- Starr R, Hilton DJ, 1999, Negative regulation of the JAK/STAT pathway., *Bioessays*, **21**(1), 47-52
- Streuli M, 1996, Protein tyrosine phosphatases in signalling., *Curr Opin Cell Biol*, **2**, 182-8
- Su L, Zhao S, Bouchard P, Bandville D, Fischer EH, Krebs EG, Shen SH, 1996, Positive effect of overexpressed protein tyrosine phosphatase PTP1C on mitogen activated signalling in 293 cells., *J Biol Chem*, **271**(17), 10385-90
- Sun H, Tonks NK, 1994, The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signalling., *Trends Biochem Sci*, **11**, 480-5
- Taddei ML, Chiarugi P, Cirri P, Buricchi F, Fiaschi T, Giannoni E, Talini D, Cozzi G, Formigli L, Raugei G, Ramponi G, 2002, Beta-catenin interacts with low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase leading to cadherin-mediated cell-cell adhesion increase., *Cancer Res*, **62**(22), 6489-99
- Terasawa K, Okazaki K, Nishida E, 2003, Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway., *Gene Cells*, **8**(3), 263-73
- Tetsu O, McCormick F, 1999, Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells., *Nature*, **398**(6726), 422-6
- Tomic S, Greiser U, Lammers R, Kharitonov A, Imyaninov E, Ullrich A, Bohmer FD, 1995, Association of SH2 domain protein tyrosine phosphatases with the epidermal growth factor receptor in human tumor cells. Phosphatidic acid activates receptor dephosphorylation by PTP1C., *J Biol Chem*, **270**(36), 21277-84
- Tonks NK, Neel BG, 2001, Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases., *Curr Opin Cell Biol*, **2**, 182-95

- Tonks NK, Diltz CD, Fischer EH, 1988, Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta., *J Biol Chem*, **14**, 6731-7
- Transy C, Legrain P, 1995, The two-hybrid: an in vivo protein-protein interaction assay., *Mol Biol Rep*, **21**(2), 119-27
- Travis A, Amsterdam A, Belanger C, Grosschedl R, 1991, LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function., *Genes Dev*, **5**, 880-94
- Tsukita S, Furuse M, 2002, Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheet., *Current Opinion in Cell Biology*, **14**, 531-6
- Uesugi Y, Fuse I, Toba K, Kishi K, Furukawa T, Koike T, Aizawa Y, 1999, Involvement of SHP-1, a phosphotyrosine phosphatase, during myeloid cell differentiation in acute promyelocytic leukemia cell lines., *Eur J Haematol*, **62**(4), 239-45
- Ushiro H, Cohen S, 1980, Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes., *J Biol Chem*, **18**, 8363-5
- Vambutas V, Kaplan DR, Sells MA, Chernoff J, 1995, Nerve growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and activation of Src homology-containing protein-tyrosine phosphatase 1 in PC12 cells., *J Biol Chem*, **270**(43), 25629-33
- Van Vactor D, 1998, Protein tyrosine phosphatases in the developing nervous system., *Curr Opin Cell Biol*, **10**(2), 174-81
- Waltzer L, Bienz M, 1998, Drosophila CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling., *Nature*, **6701**, 521-5
- van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Battle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Van Vactor D, O'Reilly AM, Neel BG, 1998, Genetic analysis of protein tyrosine phosphatases., *Curr Opin Genet Dev*, **8**(1), 112-26
- Weaver SA, Ward SG, 2001, Phosphoinositide 3-kinases in the gut: a link between inflammation and cancer., *Trends in Mol Med*, **7**, 455-62
- Wheater, PR, Burkitt HG, Daniel VD, 1998, Histologie fonctionnelle, MEDSI/ McGraw-Hill, Auckland, 217-9
- Whittaker JL, Byrd PJ, Grand RJ, Gallimore PH, 1984, Isolation and characterization of four adenovirus type 12-transformed human embryo kidney cell lines., *Mol Cell Biol*, **4**(1), 110-6
- Wieschaus E, Riggelman R, 1987, Autonomous requirements for the segment polarity gene armadillo during Drosophila embryogenesis., *Cell*, **49**(2), 177-84

Wong L, Johnson GR, 1996, Epidermal growth factor induces coupling of protein-tyrosine phosphatase 1D to GRB2 via the COOH-terminal SH3 domain of GRB2., *J Biol Chem*, **271**(35), 20981-4

Wu TR, Hong YK, Wang X, Ling MY, Dragoi AM, Chung AS, Campbell AG, Han JY, Feng GS, Chin YE, 2002, SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei., *J Biol Chem*, **277**(9), 47572-80

Xiao S, Rose DW, Sasaoka T, Maegawa H, Burke TR Jr, Roller PP, Shoelson SE, Olefsky JM, 1994, Syp (SH-PTP2) is a positive mediator of growth factor-stimulated mitogenic signal transduction., *J Biol Chem*, **269**(33), 21244-8

Yetter A, Uddin S, Krolewski JJ, Jiao H, Yi T, Platanius LC, 1995, Association of the interferon-dependent tyrosine kinase Tyk-2 with the hematopoietic cell phosphatase., *J Biol Chem*, **270**(31), 18179-82

You M et Zhao Z, 1997, Positive effect of SH2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 on epidermal growth factor and interferon-gamma-stimulated activation of STAT transcription in HeLa cells., *J Biol Chem*, **272**(37), 23376-81

Yu Z, Su L, Hoglinger O, Jaramillo ML, Banville D, Shen SH, 1998, SHP-1 associates with both platelet-derived growth factor receptor and the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase., *J Biol Chem*, **273**(6), 3687-94

Zhang J, Somani AK, Siminovitch KA, 2000, Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling., *Semin Immunol*, **12**(4), 361-78

Zhang ZY, 1998, Protein-tyrosine phosphatases: biological function, structural characteristics, and mechanism of catalysis., *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **1**, 1-52